TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

RADYOAKTİF OLMAYAN LOKAL LENF DÜĞÜMÜ YÖNTEMİ KULLANILARAK ALERJİK POTANSİYELLERİ OLAN KİMYASALLARIN İRRİTAN KİMYASALLARLA FARKLILIKLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Seren ARANCIOĞLU

FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Asuman KARAKAYA

2014 – ANKARA

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Farmasötik Toksikoloji Yüksek Lisans Programı

çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 25.07.2014

Prof. Dr. Asuman Karakaya
Ankara Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi
Danışman

Prof. Dr. Benay Can Eke

Ankara Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi
Jüri Üyesi

Prof. Dr. Sinan Süzen

Ankara Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi
Jüri Üyesi

Doç. Dr. Ayşe Başak Engin

Gazi Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi
Jüri Üyesi

Doç. Dr. İlker Ateş

Ankara Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi
Jüri Üyesi

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay
İçindekiler
Önsöz
Simgeler ve Kısaltmalar
Şekiller
Çizelgeler

1. GİRİŞ **1**
1.1. İrritan Kontakt Dermatit 1
1.1.1. İrritan Kontakt Dermatitin Patofizyolojisi 3
1.1.1.1. İrritasyon ve Deri Bariyeri 3
1.1.1.2. İrritan Kontakt Dermatitte Rol Oynayan Hücreler 3
1.1.1.2.1. Langerhans Hücreleri (LH) 3
1.1.1.2.2. Keratinositler 4
1.1.1.2.3. Fibroblastlar 4
1.1.1.2.4. Endotelyal Hücreler 5
1.1.1.2.5. Dendritik Hücreler 5
1.1.1.2.6. Lenfositler 5
1.1.1.3. İrritan Kontakt Dermatitte Rol Oynayan Sitokinler ve Fonksiyonları 5
1.1.2. Kimyasalların İrritan Kontakt Dermatit Oluşturma Potansiyellerini Ölçüm Yöntemleri 7
1.1.2.1. In vitro Deri İrritasyonu Test Yöntemleri 7
1.2. Alerjik Kontak Dermatit 8
1.2.1. Alerjik Kontakt Dermatitin Patofizyolojisi 8
1.2.2. Alerjik Kontakt Dermatitte Rol Oynayan Hücreler 11
1.2.2.1. Dendritik Hücreler ve Haptene Spesifik T Hücreleri 11
1.2.2.2. Langerhans Hücreleri 12
1.2.2.3. T Lenfositleri 13
1.2.2.4. CD4 Yardımcı T (Th) Hücreleri 13

1.2.3. Alerjik Kontakt Dermatitte Rol Oynayan Sitokinler ve Fonksiyonları 14
1.2.4. Kimyasalların Alerjik Kontakt Dermatit Oluşturma Potansiyellerinin Ölçüm Yöntemleri 16
1.2.4.1. Radyoaktif Lokal Lenf Düğümü Yöntemi 16
1.2.4.2. Radyoaktif LLNA Yöntemine Alternatif Çalışmalar 19
1.2.4.3. Non-Radyoaktif LLNA Çalışmaları 19
1.2.4.4. Invitro Çalışmalar 22
1.2.4.4.1. Invitro Hücre Temelli Yöntemler (Human Cell Line Activation Test) 22
1.2.4.4.2. KeratinoSens 22
1.2.4.4.3. Direkt Peptid Reaktivite Ölçümü (DPRA) 22
1.3. Alerjik Kontakt Dermatit ile İrritan Kontakt Dermatitin Karşılaştırılması 23
1.3.1. Mekanizma Yönünden Alerjik Kontakt Dermatit ile İrritan Kontakt Dermatitin Karşılaştırılması 23
1.3.2. Klinik Olarak Alerjik Kontakt Dermatit ile İrritan Kontakt Dermatitin Karşılaştırılması 25
1.3.3. Alerjik Kontakt Dermatit ile İrritan Kontakt Dermatitinin Ayrımında Kullanılan Yöntemler 29
1.3.3.1. Klinikte Uygulanan Yama Testi (Patch Test) 29
1.3.3.2. % Kulak Kalınlığı Artışı 30
1.3.3.3. Ayrım İndeksi (Differentiation index) 30
1.4. Ex vivo BrdU:LLNA-ELISA yöntemi ile irritasyon ve alerji potansiyelleri tespit edilecek olan ve kozmetik formülasyonlarda kullanılan kimyasal maddeler 31
1.4.1. Sodyum lauril sülfat (SLS) 31
1.4.2. Kroton yağı 33
1.4.3. Dinitroklorobenzen (DNCB) 34
1.4.4. İzoöjenol 34
1.4.5. Öjenol 36
1.4.6. Paraaminobenzoik asit (PABA) 36

1.4.7. Aseton:zeytin yağı (4:1 h/h) 37
1.5. Tez Projesinin Konusu ve Amacı 37

2. GEREÇ VE YÖNTEM **38**
2.1. *Ex vivo* BrdU:LLNA-ELISA protokolü 38
2.1.1. Kimyasallar 38
2.1.2. Kullanılan Alet ve Malzemeler 40
2.1.3. Deney hayvanı 40
2.1.4. Lenfosit proliferasyonunun lenf düğümü hücrelerinde BrdU ile *ex vivo* olarak ölçülmesi 41
2.1.5. Stimülasyon indeksinin (Sİ) bulunması 42
2.1.6. Kulak kalınlığındaki % artış hesaplanması 43
2.1.7. Ayrım indeksinin bulunması 43
2.1.8. *Ex vivo* BrdU katım yöntemi uygulanarak elde edilen lenfosit kültürlerinde sitokin düzeylerinin ölçümü 44
2.1.8.1. IL-1α ölçümü 45
2.1.8.2. IL-2 ölçümü 48
2.1.8.3. IL-4 ölçümü 49
2.1.8.4. IL-5 ölçümü 51
2.1.8.5. IFN-γ ölçümü 53
2.1.8.6. TNF-α ölçümü 55
2.1.9. İstatistiksel analizler 56

3. BULGULAR **58**
3.1. DNCB kullanılarak yapılan deneyin sonuçları 58
3.1.1. DNCB maruziyeti sonucu hesaplanan lenf düğümü ağırlıkları, lenfosit sayıları ve maruziyet öncesi ve sonrası %kulak kalınlıkları değişimi 58
3.1.2. DNCB maruziyeti sonucu hesaplanan optik dansite (OD) ve stimülasyon indeksi (SI) değerleri 59
3.1.3. DNCB uygulanan farelerin kulak arkası lenf düğümlerinden elde edilen lenfosit hücre kültürlerindeki sitokin düzeyleri 60

3.2. Öjenol kullanılarak yapılan deneyin sonuçları 61
3.2.1. Öjenol maruziyeti sonucu hesaplanan lenf düğümü ağırlıkları, lenfosit sayıları ve maruziyet öncesi ve sonrası % kulak kalınlıkları değişimi 61
3.2.2. Öjenol maruziyeti sonucu hesaplanan optik dansite (OD) ve stimülasyon indeksi (SI) değerleri 62
3.2.3. Öjenol uygulanan farelerin kulak arkası lenf düğümlerinden elde edilen lenfosit hücre kültürlerindeki sitokin düzeyleri 63
3.3. İzoöjenol kullanılarak yapılan deneyin sonuçları 64
3.3.1. İzoöjenol maruziyeti sonucu hesaplanan lenf düğümü ağırlıkları, lenfosit sayıları ve maruziyet öncesi ve sonrası % kulak kalınlıkları değişimi 64
3.3.2. İzojenol maruziyeti sonucu hesaplanan optik dansite (OD) ve stimülasyon indeksi (SI) değerleri 65
3.3.3. İzoöjenol uygulanan farelerin kulak arkası lenf düğümlerinden elde edilen lenfosit hücre kültürlerindeki sitokin düzeyleri 65
3.4. Kroton yağı kullanılarak yapılan deneyin sonuçları 67
3.4.1. Kroton yağı maruziyeti sonucu hesaplanan lenf düğümü ağırlıkları, lenfosit sayıları ve maruziyet öncesi ve sonrası % kulak kalınlıkları değişimi 67
3.4.2. Kroton yağı maruziyeti sonucu hesaplanan optik dansite (OD) ve stimülasyon indeksi (SI) değerleri 68
3.4.3. Kroton yağı uygulanan farelerin kulak arkası lenf düğümlerinden elde edilen lenfosit hücre kültürlerindeki sitokin düzeyleri 69
3.5. SLS kullanılarak yapılan deneyin sonuçları 70
3.5.1. SLS maruziyeti sonucu hesaplanan lenf düğümü ağırlıkları, lenfosit sayıları ve maruziyet öncesi ve sonrası % kulak kalınlıkları değişimi 70
3.5.2. SLS maruziyeti sonucu hesaplanan optik dansite (OD) ve stimülasyon indeksi (SI) değerleri 71

3.5.3. SLS uygulanan farelerin kulak arkası lenf düğümlerinden elde edilen lenfosit hücre kültürlerindeki sitokin düzeyleri 72
3.6. Sadece AOO uygulanan ve farklı konsantrasyonlarda AOO içinde çözünen DNCB, öjenol, izoöjenol, kroton yağı, SLS ve PABA uygulanan 8-12 haftalık dişi Balb/c farelerin kulak arkası lenf düğümlerinden elde edilen hücrelerden salınan sitokin düzeylerinin grafikler ile gösterimi 73

5. TARTIŞMA **79**

6. SONUÇ VE ÖNERİLER **85**

ÖZET **88**
SUMMARY **89**
KAYNAKLAR **90**
ÖZGEÇMİŞ **99**

ÖNSÖZ

“Radyoaktif Olmayan Lokal Lenf Düğümü Yöntemi Kullanılarak Alerjik Potansiyelleri Olan Kimyasalların İrritan Kimyasallarla Farklılıklarının Değerlendirilmesi” başlıklı yüksek lisans tezimi hazırlamamda, proje danışmanlığımı yaparak, bilgi ve tecrübelerinden yararlanma fırsatı vererek, destek ve yardımlarını benden esirgemeyen çok değerli hocam Prof. Dr. Asuman Karakaya’ ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarımın her aşamasında beni hiç yalnız bırakmayan, her konuda desteğini hissettiğim, bilgi ve tecrübesini her zaman benimle paylaşan ve sonrasında da yardım ve desteklerini benden esirgemeyeceğini ve yanımda olacağını bildiğim çok sevgili Dr. Özge Ülker hocama çok teşekkür ederim.

Çalışmalarım için her türlü olanağı sağlayan saygıdeğer Anabilim Dalımız Öğretim Üyesi hocalarıma da teşekkürlerimi sunarım.

Uzakta olsalar da her zaman varlıklarını yanımda hissettiğim, en stresli dönemlerimde bana moral vererek lisansüstü programımı tamamlamama yardımcı olan, her zaman desteklerini hissettiğim canım aileme çok teşekkür ederim.

Çalışmalarım boyunca her türlü yardım ve desteğini benden esirgemeyen Op.Dr. Cihan İnan’ a da çok teşekkür ederim.

Ayrıca Konya Kulu Devlet Hastanesi Başhekimi Op. Dr. Mehmet Doğmuş’a birlikte çalıştığımız süre boyunca eğitime verdiği desteklerinden dolayı teşekkürlerimi sunarım.

SİMGELER VE KISALTMALAR

AOO	Aseton:Zeytin yağı
BrdU	Bromodeoksiuridin
cRT-PCR	Competitive Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction
DNCB	Dinitroklorobenzen
DPRA	Direkt Peptit Reaktivite
ECVAM	European Centre for the Validation of Alternative Methods
ELISA	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
FDA	Food and Drug Administration
HSE	UK Health and Safety Executive
ICCVAM	Interagency Coordinating Comittee on the Validation of Alternative Methods
IFRA	the International Fragrance Association
IFN-γ	İnterferon-gamma
IL	İnterlökin
LH	Langerhans Hücreleri
LLNA	Lokal Lenf Düğümü Yöntemi
OECD	Organization for Economic Cooperation and Development
PABA	Paraaminobenzoik asit
PBS	Fosfat tampon çözeltisi
REACH	Registration, Evaluation and Authorization of the Chemicals
SI	Stimülasyon İndeksi
SLS	Sodyum Lauril Sülfat
Th	Yardımcı T hücreleri
TNF-α	Tumor Necrosis Factor-alpha

ŞEKİLLER

Şekil 1.1.	İrritan kontakt dermatitin immünolojik mekanizması	2
Şekil 1.2.	Episkin™, Epiderm™ ve SkinEthic™ yöntemlerinde kullanılan yapay epiderm modeli	7
Şekil 1.3.	Th hücrelerinin immün yanıttaki rolü	10
Şekil 1.4.	Alerjik kontakt dermatit oluşumunun patofizyolojik mekanizması	11
Şekil 1.5.	Radyoaktif Lokal lenf düğümü yönteminin şematik gösterimi	18
Şekil 1.6.	Ellerde oluşmuş alerjik kontakt dermatit	28
Şekil 1.7.	Hint kınasının neden olduğu irritan kontakt dermatit	28
Şekil 2.1.	ELISA yöntemi ile sitokin ölçümü	45
Şekil 2.2.	Standart ve örneklerin ELISA plağına uygulanışı	46
Şekil 2.3.	IL-1α miktarının ölçümünde kullanılan standart doğru denklemi	47
Şekil 2.4.	IL-2 miktarının ölçümünde kullanılan standart doğru denklemi	49
Şekil 2.5.	IL-4 miktarının ölçümünde kullanılan standart doğru denklemi	51
Şekil 2.6.	IL-5 miktarının ölçümünde kullanılan standart doğru denklemi	53
Şekil 2.7.	IFN-γ miktarının ölçümünde kullanılan standart doğru denklemi	55
Şekil 2.8.	TNF-α miktarının ölçümünde kullanılan standart doğru denklemi	57
Şekil 3.1.	Sadece AOO uygulanan ve farklı konsantrasyonlarda AOO içinde çözünen DNCB uygulanan 8-12 haftalık dişi Balb/c farelerin kulak arkası lenf düğümlerinden elde edilen hücrelerden salınan sitokin düzeylerinin grafikler ile gösterimi	73

Şekil 3.2. Sadece AOO uygulanan ve farklı konsantrasyonlarda AOO içinde çözünen öjenol uygulanan 8-12 haftalık dişi Balb/c farelerin kulak arkası lenf düğümlerinden elde edilen hücrelerden salınan sitokin düzeylerinin grafikler ile gösterimi 74

Şekil 3.3. Sadece AOO uygulanan ve farklı konsantrasyonlarda AOO içinde çözünen izoöjenol uygulanan 8-12 haftalık dişi Balb/c farelerin kulak arkası lenf düğümlerinden elde edilen hücrelerden salınan sitokin düzeylerinin grafikler ile gösterimi 75

Şekil 3.4. Sadece AOO uygulanan ve farklı konsantrasyonlarda AOO içinde çözünen kroton yağı uygulanan 8-12 haftalık dişi Balb/c farelerin kulak arkası lenf düğümlerinden elde edilen hücrelerden salınan sitokin düzeylerinin grafikler ile gösterimi 76

Şekil 3.5. Sadece AOO uygulanan ve farklı konsantrasyonlarda AOO içinde çözünen SLS uygulanan 8-12 haftalık dişi Balb/c farelerin kulak arkası lenf düğümlerinden elde edilen hücrelerden salınan sitokin düzeylerinin grafikler ile gösterimi 77

Şekil 3.6. Sadece AOO uygulanan ve farklı konsantrasyonlarda AOO içinde çözünen PABA uygulanan 8-12 haftalık dişi Balb/c farelerin kulak arkası lenf düğümlerinden elde edilen hücrelerden salınan sitokin düzeylerinin grafikler ile gösterimi 78

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1.	İrritan kontakt dermatitte rol oynayan sitokinler ve fonksiyonları	6
Çizelge 1.2.	Alerjik kontakt dermatitte rol oynayan sitokinler ve fonksiyonları	15
Çizelge 1.3.	Klinik olarak alerjik kontakt dermatit ile irritan kontakt dermatitin karşılaştırılması	27
Çizelge 1.4.	Fragrans karışımının içeriğindeki maddeler	35
Çizelge 3.1.	AOO ile çözünmüş farklı konsantrasyonlardaki DNCB ve PABA maruziyeti sonrası farelerin lenf düğümü ağırlıkları, hücre sayıları ve % kulak kalınlıkları değişimi	58
Çİzelge 3.2.	AOO ile çözünmüş farklı konsantrasyonlardaki DNCB ve PABA maruziyeti sonrası hesaplanan Optik Dansite ve Stimülasyon İndeksi değerleri	59
Çizelge 3.3.	AOO ile çözünmüş farklı konsantrasyonlardaki DNCB ve PABA maruziyeti sonrası ölçülen sitokin düzeyleri	60
Çizelge 3.4.	AOO ile çözünmüş farklı konsantrasyonlardaki öjenol ve PABA maruziyeti sonrası farelerin lenf düğümü ağırlıkları, hücre sayıları ve % kulak kalınlıkları değişimi	61
Çizelge 3.5.	AOO ile çözünmüş farklı konsantrasyonlardaki öjenol ve PABA maruziyeti sonrası hesaplanan Optik Dansite ve Stimülasyon İndeksi değerleri	62
Çizelge 3.6.	AOO ile çözünmüş farklı konsantrasyonlardaki öjenol ve PABA maruziyeti sonrası ölçülen sitokin düzeyleri	63
Çizelge 3.7.	AOO ile çözünmüş farklı konsantrasyonlardaki izoöjenol ve PABA maruziyeti sonrası farelerin lenf düğümü ağırlıkları, hücre sayıları ve % kulak	

kalınlıkları değişimi 64

Çizelge 3.8. AOO ile çözünmüş farklı konsantrasyonlardaki öjenol ve PABA maruziyeti sonrası hesaplanan Optik Dansite ve Stimülasyon İndeksi değerleri 65

Çizelge 3.9. AOO ile çözünmüş farklı konsantrasyonlardaki izoöjenol ve PABA maruziyeti sonrası ölçülen sitokin düzeyleri 66

Çizelge 3.10. AOO ile çözünmüş farklı konsantrasyonlardaki kroton yağı ve PABA maruziyeti sonrası farelerin lenf düğümü ağırlıkları, hücre sayıları ve % kulak kalınlıkları değişimi 67

Çizelge 3.11. AOO ile çözünmüş farklı konsantrasyonlardaki kroton yağı ve PABA maruziyeti sonrası hesaplanan Optik Dansite ve Stimülasyon İndeksi değerleri 68

Çizelge 3.12. AOO ile çözünmüş farklı konsantrasyonlardaki kroton yağı ve PABA maruziyeti sonrası ölçülen sitokin düzeyleri 69

Çizelge 3.13. AOO ile çözünmüş farklı konsantrasyonlardaki SLS ve PABA maruziyeti sonrası farelerin lenf düğümü ağırlıkları, hücre sayıları ve % kulak kalınlıkları değişimi 70

Çizelge 3.14. AOO ile çözünmüş farklı konsantrasyonlardaki SLS ve PABA maruziyeti sonrası hesaplanan Optik Dansite ve Stimülasyon İndeksi değerleri 71

Çizelge 3.15. AOO ile çözünmüş farklı konsantrasyonlardaki SLS ve PABA maruziyeti sonrası ölçülen sitokin düzeyleri 72

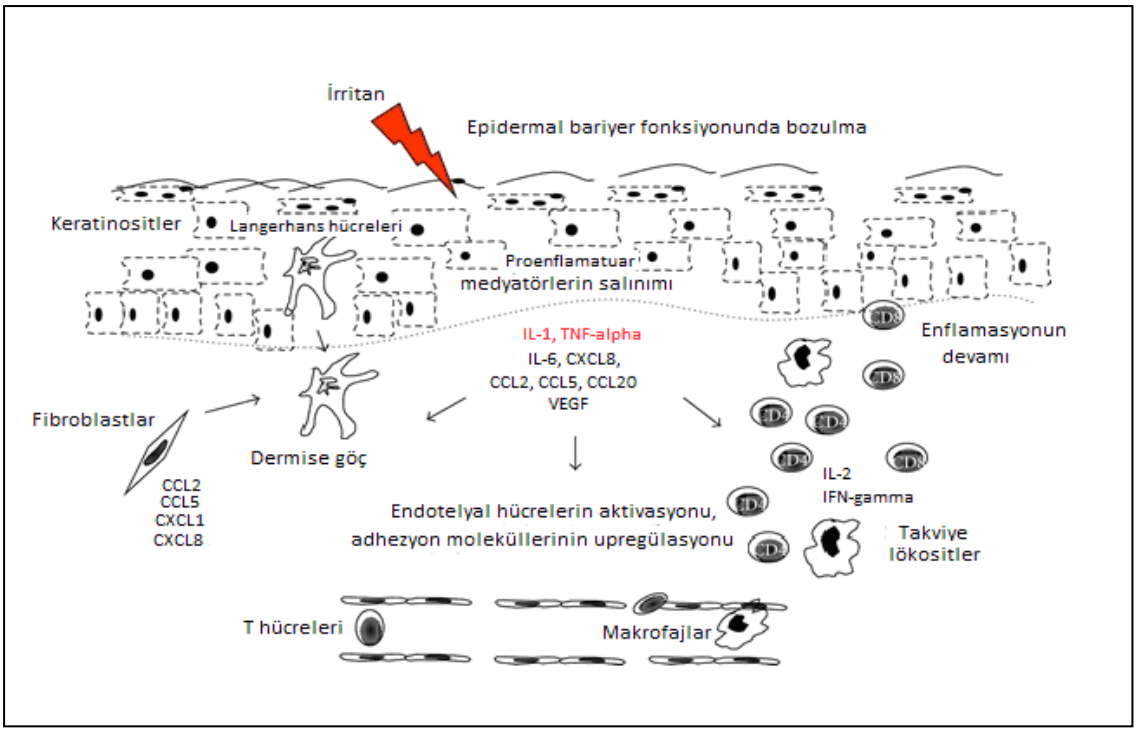
1. GİRİŞ

Deri, insan vücudunun en dış bariyeri olduğu için, çevreden gelen kimyasal ve fiziksel faktörlerden en çok etkilenen yapıdır. Deri yolu ile kimyasallara maruziyetin klinik sonucu olarak kontakt dermatit ortaya çıkar. Patofizyolojik mekanizmasına göre kontakt dermatit, temel olarak iki tiptedir. İrritan kontakt dermatit, derinin doğal immünitesini aktive eden ksenobiyotiklerin, fiziksel ve kimyasal özelliklerinin sitotoksik etkilerine bağlıdır. Alerjik kontakt dermatit ise deri enflamasyonuna aracılık eden efektör Th1 hücrelerine bağlı olarak antijene karşı sonradan kazanılmış immünite (spesifik immünite) aktivasyonunu gerektirir (Saint-Mezard ve ark., 2004).

1.1. İrritan Kontakt Dermatit

Deri irritasyonu, doğal immün sistem kaynaklı, lokal, geri dönüşümlü enflamatuar reaksiyon olarak tanımlanır. Akut irritan kontakt dermatit enflamasyon ile karakterize iken kronik irritan kontakt dermatit genel olarak hiperproliferasyon ve hiperkeratozis ile karakterizedir. İrritan kontakt dermatit, iç ve dış faktörlere bağlı olarak gelişebilmektedir. Örneğin, yaş, genetik yatkınlık, cinsiyet, dermatit öyküsü önemli olabilir. Ayrıca, maddelerin kimyasal özellikleri (moleküler ağırlığı, molaritesi, iyonize hali) deri absorbsiyonunu etkileyeceği için irritasyonda etkilidir. Bunun yanında, kimyasala maruz kalınan konsantrasyon ve maruziyet süresi de irritasyonun oluşumu için birer etkendir (Berardesca ve Distante, 1994). Klinik olarak irritasyon kaşınma, batma, yanma ve sızlamanın gelişmesi ile karakterize belirtiler göstermektedir ancak bunlar irritasyon için objektif olarak ayırıcı klinik işaretler değildir (Fluhr ve ark., 2008).

Deri irritasyonunun patofizyolojik mekanizması oldukça komplekstir ve aydınlatılmasına yönelik çalışmalar yapılmaktadır. Farklı deri irritanları farklı enflamatuar prosesini tetikleyebilir. İrritanlar deri dokusunu direkt olarak etkilemenin yanında reaktif oksijen türevleri ve sitokin salınımı gerçekleştirerek de deri dokusuna zarar verebilirler.



Şekil 1.1. İrritan kontakt dermatitin immünolojik mekanizması (Lee ve ark., 2013).

Sitokinler, doğal ve kazanılmış immünitede rol oynayan ve hücrelerin immün fonksiyonlarını sağlayan proteinlerdir. Enflamatuar yanıtta hücreler arasındaki iletişimi sağlarlar, lokal etkileşimleri vardır ve birçok hücre tipi tarafından üretilebilirler. Sitokinler direkt olarak immün sistem hücreleri olan lenfositlerin gelişimini, bölünmesini ve farklılaşmasını regüle ederler (Corsini ve Galli, 1998).

1.1.1. İrritan Kontakt Dermatitin Patofizyolojisi

1.1.1.1. İrritasyon ve Deri Bariyeri

Derinin epiderm tabakasının bariyer bütünlüğü, irritanların insan derisiyle etkileşmesinde önemli bir rol oynar. Atopik dermatitli hastalarda, epiderm bariyer disfonksiyonunun olduğu bilinir. Deri bariyerinin hasarında irritanın kimyasal yapısı önemlidir. Aseton gibi organik çözücüler, stratum korneumdaki lipitleri etkileyerek epiderm bariyerin bozulmasına neden olurlar. Sodyum lauril sülfat (SLS) gibi anyonik surfaktanlar, keratin gibi proteinlerin yapısını bozarlar ve stratum korneumda hiperhidrasyona ve lipit tabaka yapısının bozulmasına sebep olurlar. Deri bariyerindeki hasar sonucu hücresel değişimler meydana gelir ve proenflamatuar sitokinlerin salınımı gerçekleşir (Lee ve ark., 2013).

1.1.1.2. İrritan Kontakt Dermatitte Rol Oynayan Hücreler

1.1.1.2.1. Langerhans Hücreleri (LH)

Özel bir tür kan hücreleridir. Derinin dış tabakası epidermiste ve lenf düğümlerinde geniş çapta görülen hücre tipleridir. İmmün sistemin en önemli unsurlarından olan langerhans hücreleri (LH) enflamasyonu önlemek için çalışırlar ve T hücreleriyle etkileşerek immün reaksiyonları tetiklemeye yardımcı olurlar. Fagozisitoz yapma özellikleri olup bazı lenfositlerin üretimini ayarlayabilirler.

Langerhans hücreleri immün bir reaksiyon sırasında birçok hücre tipini aktive ederek proenflamatuar sitokin salınımına neden olurlar. Birincil salınan sitokinler olan Tumor necrosis factor-alpha (TNF-α) ve interlökin-1beta (IL-1β) salınarak enflamatuar cevabın başlaması

sağlanırken, kimyasal maddeye maruziyetin sürmesi halinde diğer birçok sitokin salınımı aktive olarak enflamatuar cevabın devamlılığı sağlanır (Lee ve ark., 2013).

1.1.1.2.2. Keratinositler

Keratinositler immün medyatör oluşumunda majör rol oynayan hücrelerdir. Deri bariyerindeki hasar, enflamatuar aşamada oluşan IL-1α salınımına bağlanmaktadır. Birçok *in vitro* çalışmada, çeşitli irritanların, keratinositlerde IL-1α ekspresyonunu indüklediği gösterilmiştir. IL-1α 'nın aktivasyonu başka proenflamatuar sitokin ve kemokinlerin (IL-1β, TNF-α, IL-6 ve IL-8) de oluşumunu stimule etmektedir.

IL-1α irritasyonun gelişmesinde önemli bir rol oynamaktadır. IL-1α 'nın hasarlı keratinosit kaynaklı olduğu hipotezi ortaya konmuştur. SLS' ın tekrarlayan dozlarda uygulanmasında IL-1 reseptör antagonisti/IL-1α oranı yüksek bulunmuştur. IL-1 reseptör antagonisti ile IL-1α arasındaki denge enflamatuar cevabın regülasyonunda önemli bir rol oynamaktadır (Fluhr ve ark., 2008).

İrritan kontakt dermatitte diğer önemli sitokin TNF-α 'dır. Dimetil sülfoksit (DMSO), PMA, formaldehit, tributiltin ve SLS gibi irritanların uygulanmasında TNF-α 'nın arttığı rapor edilmiştir (Hoefakker ve ark., 1995; Kondo ve ark., 1994; Corsini ve ark., 1997). TNF-α ayrıca IL-1, IL-6, IFN-γ, CXCL8 gibi enflamatuar medyatörlerin indüksiyonuna da sebep olur.

1.1.1.2.3. Fibroblastlar

Fibroblastlar irritan kimyasalın dermise penetrasyonu sonucu indirekt olarak salınan keratinosit kaynaklı hücrelerdir. Keratinositler

fibroblastları aktive ederek sitokin salınımını uyarırlar (Newby ve ark., 2000).

1.1.1.2.4. Endotelyal Hücreler

İrritanlara maruziyeti takiben endotel hücrelerdeki adhezyon molekülleri ve kemokinlerin artışı ile deride dendritik hücre, makrofaj ve T hücresi gibi immün hücrelerin göçü kolaylaşmaktadır (Eberhard ve ark., 2004).

1.1.1.2.5. Dendritik Hücreler

Dendritik hücrelerin rolü tam olarak karakterize edilememiştir. İrritanların deriye topik uygulanmasından sonra epidermal Langerhans hücrelerinin dermise göç ettiği ve makrofaj ve dendritik hücrelerin immün cevapta fagositoz özellikleri ile rol aldıkları gösterilmiştir (Ouwehand ve ark., 2010).

1.1.1.2.6. Lenfositler

İrritan kontakt dermatitte T lenfositlerin rolü henüz tam olarak açıklanamamıştır. İrritan kontakt dermatitin akut reaksiyonlarında CD8+ sitotoksik T hücrelerinin yanında, CD4+ lenfositlerden salınan IL-2 ve IFN-γ (Th1 sitokinleri) düzeylerinde de artış görülmüştür. Sonraları Th17 hücrelerinin alerjik kontakt dermatit patojenezisinde yer aldığına dair çalışmalar bulunmuştur. (Hoefakker ve ark., 1995).

1.1.1.3. İrritan Kontakt Dermatitte Rol Oynayan Sitokinler ve Fonksiyonları

İrritan kontakt dermatitte rol oynayan sitokinler, bu sitokinlerin kaynakları ve fonksiyonları aşağıdaki çizelgede özetlenmiştir.

Çizelge 1.1. İrritan kontakt dermatitte rol oynayan sitokinler ve fonksiyonları (Lee ve ark., 2013)

Sitokin	**Kaynak**	**Fonksiyon**
IL-1	Keratinosit Langerhans hücreleri Monosit/Makrofaj T hücreleri Endotelyal hücreler	Proenflamatuar Adhezyon molekülünü arttırmak IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IFN-γ, CXCL8 ve CCL20 yi indüklemek Langerhans hücre göçünü sağlamak
IL-6	Keratinosit Langerhans hücreleri Monosit/Makrofaj Fibroblast Endotelyal hücreler	Proenflamatuar Nötrofil ve T hücreleri için kemotaksis Keratinosit proliferasyonu
TNF-α	Keratinosit Dendritik hücreler Monosit/Makrofaj Mast hücreleri Fibroblastlar Lenfositler	Proenflamatuar T hücrelerini, makrofajları, granülositleri aktive etmek IL-1, IL-6, IL-8, TNF i indüklemek Hücresel adhezyon molekülü ekspresyonu
IFN-γ	Lenfositler Keratinosit	Proenflamatuar Adhezyon molekülünü arttırmak
CXCL8	Keratinosit Monosit/Makrofaj T hücreleri Endotelyal hücreler Fibroblast Nötrofil Lenfosit	Proenflamatuar Kemotaksis Nötrofil aktivasyonu

1.1.2. Kimyasalların İrritan Kontakt Dermatit Oluşturma Potansiyellerini Ölçüm Yöntemleri

1.1.2.1. *In vitro* Deri İrritasyonu Test Yöntemleri

Kimyasallarla indüklenen deri irritasyonunun test edilmesi için OECD kılavuzunda da yer alan *in vivo* hayvan yönteminin (Draize tavşan testi) yerine *in vitro* test yöntemlerinin kullanılması zorunlu hale gelmiştir. Bu *in vitro* test yöntemlerinden ECVAM tarafından validasyonu tamamlanan yöntemler Episkin™, Epiderm™ ve SkinEthic™ test yöntemleridir. Bu yöntemlerde yapay epidermis modeli kullanılmaktadır.



Şekil 1.2. Episkin™, Epiderm™ ve SkinEthic™ yöntemlerinde kullanılan yapay epiderm modeli

OECD kılavuzunda bulunan bu yöntem, *in vitro* deri irritasyonu:yapay epidermis test metodu olarak geçmektedir. Episkin™, Epiderm™ ve SkinEthic™ yöntemlerinin prensibi, vital bir boya olan tetrazolium tuzu olan MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid) bileşiğinin, canlı hücrelerin mitokondrileri tarafından çözünmez mavi renkli formazon ürününe dönüştürülmesi esasına dayanır. Farklı

konsantrasyonlardaki test materyali negatif ve pozitif kontroller halinde hazırlanarak epiderm dokularına 60 dk maruz bırakılır. Maruziyet süreleri bittikten sonra, dokular inkübatörden çıkarılır ve MTT canlılık testiyle hücre canlılığı ELISA plaka okuyucusunda 570 nm'de okunur. Oluşan mavi renk canlı hücre oranını verir. Canlı hücre sayısı %50'den az ise, kimyasal madde uygulanan dozda irritan etkilidir, yorumu yapılır (OECD kılavuzu 439, 2013).

1.2. Alerjik Kontak Dermatit

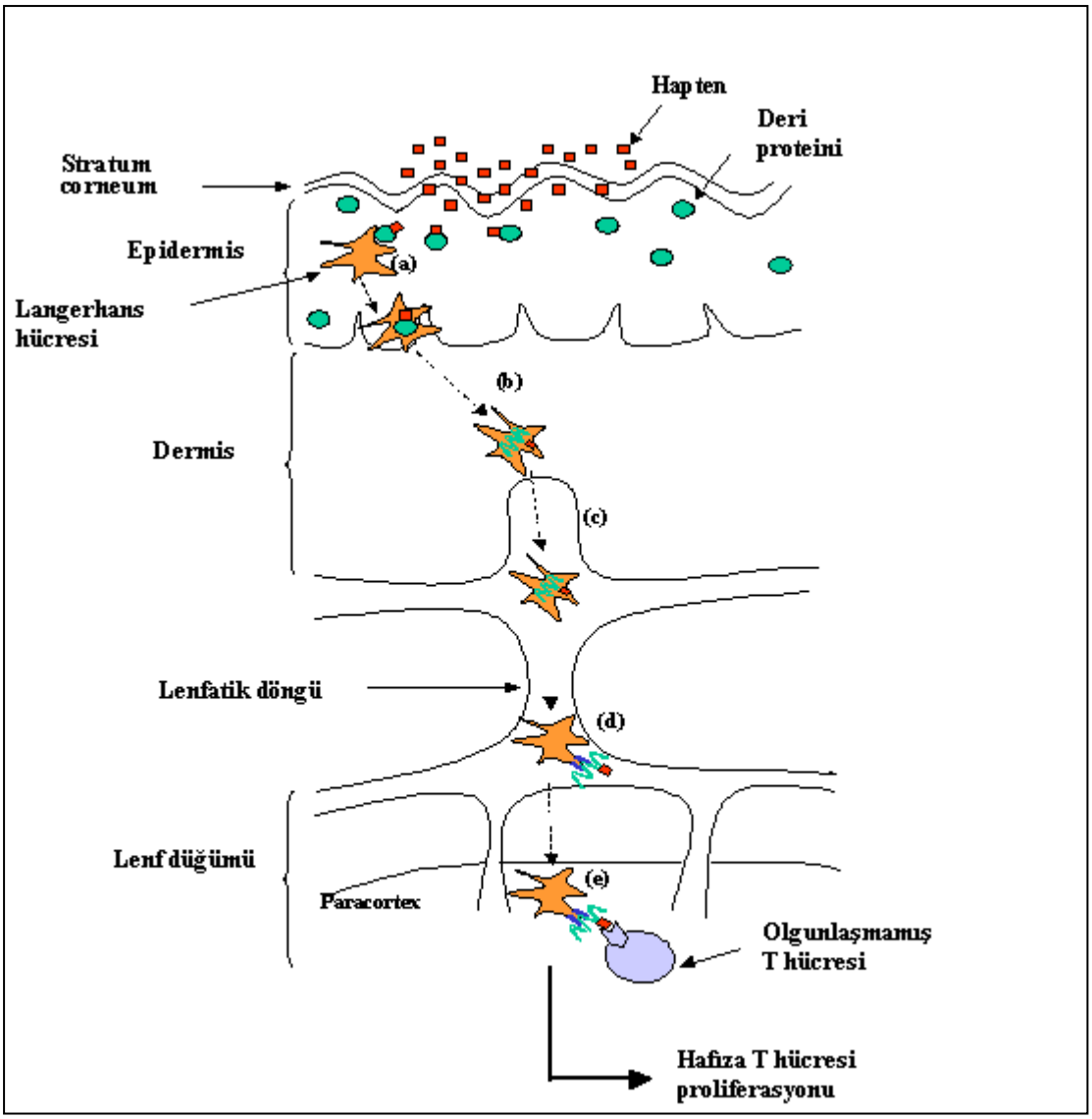
1.2.1. Alerjik Kontakt Dermatitin Patofizyolojisi

Alerjik kontakt dermatiti iki farklı fazdan oluşur.

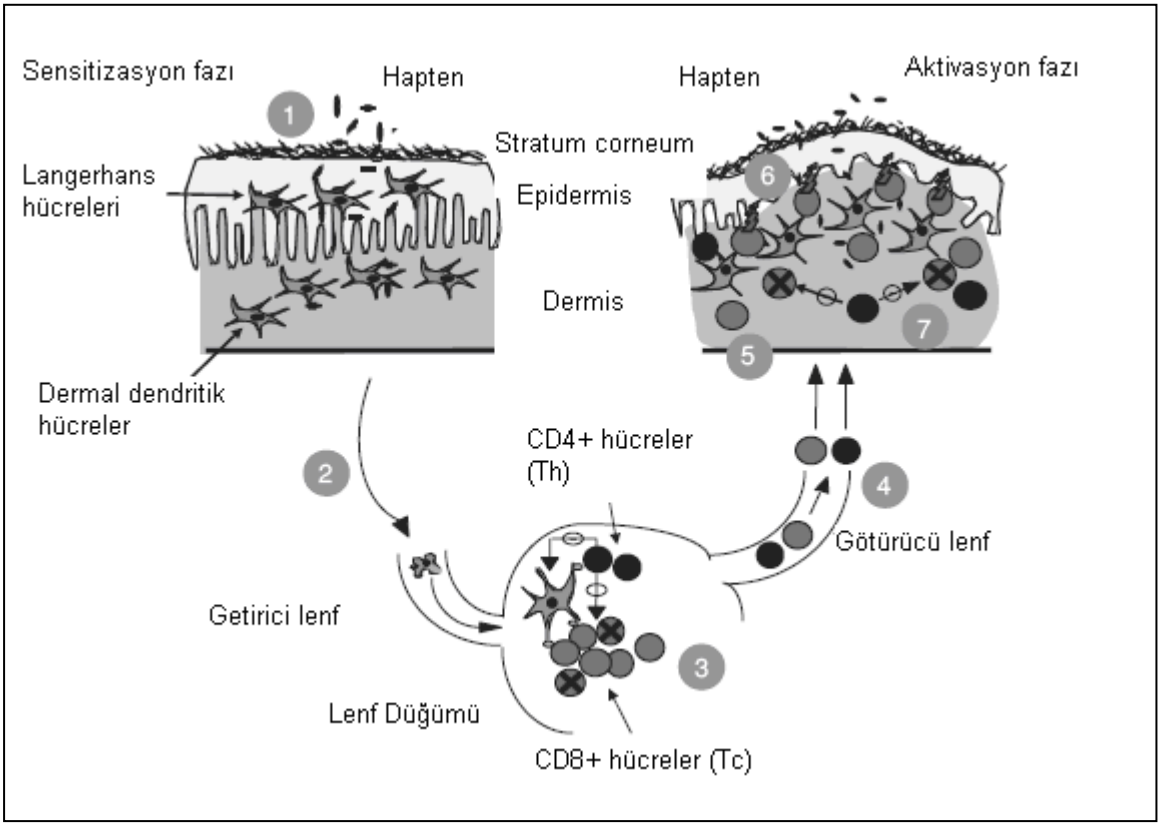
1. Faz: Sensitizasyon (duyarlandırma) fazı : İndüksiyon fazı olarak da tanımlanır. Derinin hapten ile ilk temasını oluşturur ve lenf düğümlerinde hapten-spesifik T hücrelerinin oluşumuna ve bunların tekrar deriye göçüne sebep olur. Diğer bir deyişle; deriye giren antijenik maddeler veya haptenler, epidermisteki özelleşmiş doku makrofajları olan Langerhans hücreleri (antijen sunan hücreler, APC) tarafından fagosite edilir. Lenfatik dolaşım yolu ile dermise ve bölgesel lenf bezlerine göç eden bu hücreler, antijen haline dönüşen molekülü, dermiste ve lenf bezlerinin parakortikal bölgesinde T lenfositlere (Th1 altgrubu) sunarlar. Antijenik uyarım sonucu lenfositlerde proliferasyon başlar ve deriye giren antijene spesifik T lenfositler (klon) oluşur. Bu duyarlanmış lenfositler dolaşıma karışır, bir kısmı da dermise yerleşir. Bu olaylar zincirine sensitizasyon (duyarlanma fazı) denir. İnsanlarda yaklaşık olarak 2 hafta, farelerde 5-7 gün arası kadar bir süre içinde gerçekleşir. Haptenin sensitizasyonu indüklemesi iki farklı özelliğine dayanır: Pro-enflamatuar özelliğinin yanında, hapten, derinin doğal immünitesini aktivite eder ve dendritik

hücrelerin olgunlaşmasını ve göçünü indükleyen sinyallerin oluşmasını sağlarlar (Saint-Mezard ve ark., 2004).

2. Faz: Ortaya çıkma (aktivasyon) fazı: Sensitize bireyler aynı haptenle tekrar karşılaşınca, 24-72 saatte alerjik kontakt dermatit oluşur. Hapten deriye difüze olduktan sonra, haptenle birleşmiş peptid kompleksleri deri hücreleri tarafından içeri alınır. Organizma, aynı antijenle ikinci defa karşılaşacak olursa; deride duyarlı lenfositlerle antijenin birleşmesi sonucu, bir takım çözünür faktörler (sitokinler) ortaya çıkar, bu faktörlere bağlı olarak da lokal doku hasarı ve enflamasyon meydana gelir. Bu sitokinlerin başlıcaları; IL-1 (Langerhans hücrelerince salınır, T lenfositlerden IL-2 salınmasına yol açar), IL-2 (T lenfositlerden salgılanır, diğer T hücrelerini aktive eder), interferon gamma (IFN-γ) (T lenfositlerden salgılanır, sitotoksik T hücreleri, NK (doğal katil hücreleri) hücreleri ve makrofajları aktive eder). Sonuçta; epidermiste ödem (spongioz) ve vezikülasyon, dermiste ise enflamatuar infiltrat oluşur. Bu safhaya ortaya çıkma (aktivasyon) fazı denir ve 24-72 saat içinde gerçekleşir ve bu sebepten dolayı geç tip (tip IV) alerjik reaksiyon olarak adlandırılır. Enflamatuar reaksiyon birkaç gün sürer, daha sonra down-regülasyon mekanizmaları ile azalır (Saint-Mezard ve ark., 2004).



Şekil 1.3. Th hücrelerinin immün yanıttaki rolü (Smith Pease ve ark., 2003).



Şekil 1.4. Alerjik kontakt dermatit oluşumunun patofizyolojik mekanizması (Saint-Mezard ve ark., 2004)

1.2.2. Alerjik Kontakt Dermatitte Rol Oynayan Hücreler

1.2.2.1. Dendritik Hücreler ve Haptene Spesifik T Hücreleri

Alerjik kontakt dermatit, duyarlı bireylerde oluşan T hücre aracılı enflamatuar reaksiyonlardır. Alerjik kontakt dermatit, haptene spesifik T hücre aracılı deri enflamasyonu olarak tanımlanır ve kontakt hipersensitivite veya kontakt sensitivite olarak da adlandırılır (Krasteva ve ark.,1999). Deri ve lenf düğümleri, kontakt sensitivite reaksiyonlarının indüksiyonunda ve başlamasında merkezi bir rol oynar. Kontakt sensitivitenin oluşması için şu üç eleman gereklidir:

Antijen sunan dendritik hücreler, haptene spesifik T hücreleri ve haptenin kendisi (Saint-Mezard ve ark., 2004). Alerjik kontakt dermatiti başlatan bileşiklerin orjinleri ve yapıları farklıdır fakat bazı ortak noktaları mevcuttur. Kontakt alerjenler düşük molekül ağırlıklı kimyasallardır, hapten adını alırlar. Kendileri immünojenik değillerdir, epidermal proteinlere bağlanarak immünojenik özellik kazanırlar. Bu olaydan sonra hapten-taşıyıcı protein kompleksi şeklinde rol oynarlar, en sonunda da antijen olarak rol oynarlar. Haptenler, deri bariyerini geçebilmeleri için lipofilik özellikte olmaları gerekir. Ayrıca deri proteinlerinin nükleofilik kısımlarına bağlanabilmeleri için de elektrofilik yapı taşırlar (Lepoittevin ve ark., 1997; Berard ve ark., 2003).

1.2.2.2. Langerhans Hücreleri

Deri ile ilgili indüklenmiş immün cevaplar için kimyasal alerjenin epidermise ulaşması gereklidir. Bu durum pratikte kimyasalın stratum korneumdan geçebilmesini gerektiren fizikokimyasal özelliklerine bağlıdır. Epidermise geçiş gerçekleştikten sonra protein katım ürünleri oluşur, antijen üretimine ihtiyaç vardır. Bu birinci derecede epidermal Langerhans hücrelerinin (LH) sorumluluğundadır. Ayrıca diğer dermal dendritik hücreler de katılabilir. LH'nin kazanılmış immün sistemdeki görevleri deride karşılaştıkları antijeni tanımak, afferent lenfatik dolaşım yolu ile bölgesel lenf düğümlerine taşımaktır. LH'nin deriden hareketi ve lenf düğümleri içine sonraki lokalizasyonu epidermal sitokinler tarafından başlatılır ve regüle edilir (Kimber ve ark., 2000; Cumberbatch ve ark., 2000). LH' nin yer değiştirmesinde rol oynayan sitokinler TNF-α ve IL-1β'dır (Cumberbatch ve ark., 2000). Son yıllarda yapılan çalışmalarda IL-18'in de sorumlu olduğu belirtilmiştir (Cumberbatch ve ark., 2001). Ayrıca IL-10 gibi diğer epidermal sitokinlerin zıt regülasyonda rol

oynadığı ve LH göçünü inhibe edici en azından kontrol edici rol oynadığına dair de veriler bulunmaktadır (Wang ve ark., 1999). Alerjenin etkili transportu ve sensitizasyonun kazanılması için uygun epidermal sitokinlerin indüklenmesini ve cevapta artış olmasını sağlayacak yeterli miktarda kimyasalın deriye uygulanması gerekir. Deri sensitizasyonunun etkinliği, alerjenin gücü, deri yüzeyine uygulanan kimyasalın miktarı, indüklenen enflamasyonun derecesine bağlıdır. Bütün bu değişkenler uygun ise, immünojenik stimulasyon, langerhans hücrelerinin lenf düğümlerine hareketi ve T lenfositlerinin cevabı ile gerçekleşir.

1.2.2.3. T Lenfositleri

Deri sensitizasyonunun kazanılması, spesifik T lenfosit cevabının stimülasyonu ile olur. Alerjenle indüklenen T lenfosit cevabına karşı önemli kantitatif ve kalitatif durumlar vardır. Kantitatif olarak topik uygulanan kimyasallar tarafından indüklenen lenf düğümlerinin proliferatif cevabının kuvveti ile sensitizasyonun geliştiği alan arasında bir korelasyon vardır (Kimber ve Dearman 1991). Bu nedenle daha sonra bahsedileceği gibi indüklenmiş lenf düğümü hücrelerinin proliferatif cevabının büyüklüğü ölçülerek alerjenlerin reaktif güçlerini tespit etmek mümkündür. Bu durum LLNA testinin temelini oluşturmaktadır. Kalitatif durumlar ise T lenfositlerin fonksiyonel alt popülasyonlarının gelişimindeki farklılık ile ilgilidir (Gerberick ve ark., 2007).

1.2.2.4. CD4+ Yardımcı T (Th) Hücreleri

İnsanlarda ve kemiricilerde CD4+ yardımcı T (Th) hücrelerde heterojenlik vardır. Bu da salınan sitokin profillerini etkiler. Th

hücreler Th1 ve Th2 olarak ikiye ayrılır (Mossman ve Coffman, 1989; Romagnani, 1991; McKnight ve ark., 1991). Bazı sitokinler (örneğin, IL-3, insanda TNF-α) hem Th1 hem de Th2 hücrelerinden üretilebilirler. Bazıları ise sadece tek bir alt grup tarafından üretilirler. Th1 hücreleri, IL-2 ve IFN-γ üretimi ile karakterize iken, Th2 hücreleri IgE antikor cevabını sağlayan sitokinleri (IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13) üretirler. Bu durum CD8+ T sitotoksik (Tc) hücrelerinin katılımı ile daha komplike bir hale gelmektedir (Kimber ve ark., 2002).

1.2.3. Alerjik Kontakt Dermatitte Rol Oynayan Sitokinler ve Fonksiyonları

Sitokin analizleri, alerjik kontakt dermatitin, sensitizasyon ve aktivasyon fazlarında önemli rol oynayan yardımcı T hücrelerinin (Th) proliferasyonu ile ilişkilidir. Birçok çalışma, kimyasal alerjenleri, ürettikleri sitokin profillerine göre sınıflandırmaya çalışmıştır (Dearman ve ark., 2003; Hayashi ve ark., 2001; Manetz ve ark., 2001, Plitnick ve ark., 2002; Vandebriel ve ark., 2003; Van Och ve ark., 2002). İmmün sistem cevaplarının gelişimi, Th1 ve Th2 hücrelerinin aktivasyonu ile bu hücrelerden salınan sitokinler tarafından regüle edilir.

Çizelge 1.2. Alerjik kontakt dermatitte rol oynayan sitokinler ve fonksiyonları (Ulker ve ark., 2011)

Sitokin	**Kaynak**	**Fonksiyon**
IFN-γ	Th1	Hipersensitivite reaksiyonlarına sebep olan CD8+ sitotoksik T hücre aktivasyonu Aşı-konakçı reaksiyonları Tümör immünitesini destekleme Keratinositlerin immünolojik fonksiyonlarının regülasyonu
IL-4	Th2	Olgunlaşmamış Th hücrelerinden (Th0) Th2 hücrelerine farklılaşmasını indükleme Humoral immünite aktivitesi Hücresel immünite aktivitesi Kontakt sensitivite oluşumu Antijen spesifik IgM antikorlarını üreten B1 hücre stimülasyonu Effektör T hücrelerini bir araya getirerek lokal toplanmalarını sağlama
IL-2	Th1	T hücre klonal ekspansiyonunun başlaması Th hücre proliferasyonunda ve onarımında değişken fonksiyonlar Hem Th1 hem de IgE aracılı hipersensitivite reaksiyonları
IL-5	Th2	Eosinofillerin farklılaşmasını, fonksiyonlarını ve hayatta kalmalarını regüle etme Kontakt sensitivite oluşumu Eosinofil ve efektör T hücrelerin bir araya toplanması için gerekli olan IgM antikorlarının üreticileri olan B-1 hücrelerini etkileme
IL-1α	Th1, Th2	Proenflamatuar sitokin oluşum yanıtında artış IL-8, CCL5/RANTES gibi kemokinlerin oluşum yanıtında artış Th1 ve Th2 kaynaklı kemokinlerin oluşum yanıtında artış Langerhans hücrelerinin çeşitli fonksiyonlarının regülasyonu Bazı sitokin ve kemokinlerin oluşumlarının regülasyonu

1.2.4. Kimyasalların Alerjik Kontakt Dermatit Oluşturma Potansiyellerinin Ölçüm Yöntemleri

1.2.4.1. Radyoaktif Lokal Lenf Düğümü Yöntemi

Radyoaktif lokal lenf düğümü yöntemi, kimyasal maddelerin sensitizasyon potansiyellerinin ölçümü için kullanılmak üzere önerilmiş önemli bir test yöntemidir. Alerjen kimyasallara maruziyet sonucunda lenf düğümlerinden salınan T hücre proliferasyonu *in vivo* [^{3}H] metil timidin kullanılarak LLNA ile ölçülmektedir (Anderson ve ark., 2011). Lenfosit proliferasyonunun test materyalinin sensitizasyon potansiyeline bağlı olarak arttığı bazı kaynaklarca gösterilmiştir (Cockshott ve ark., 2006; Kimber ve ark., 1994; McGarry, 2007). Bu yöntem geniş ölçüde kabul görmüş bir yöntemdir (örneğin; OECD (Organization for Economic Cooperation and Development) kılavuzu 429, 2002; ICCVAM (Interagency Coordinating Comittee on The Validation of Alternative Methods), 1999; ECVAM (European Centre for the Validation of Alternative Methods), 2000) ve geleneksel guinea pig maksimizasyon testi ve Buehler yöntemine göre birçok avantaj taşımaktadır. Bu avantajlar; kullanılan hayvan sayısında azalma ve hayvan refahı, deney süresinde ve hızında artış, kantitatif sonuç noktaları ve güçlü karşılaştırılabilme kriterleri olarak sayılabilir (Basketter ve ark., 2007; Haneke ve ark., 2001; Sailstad ve ark., 2001).

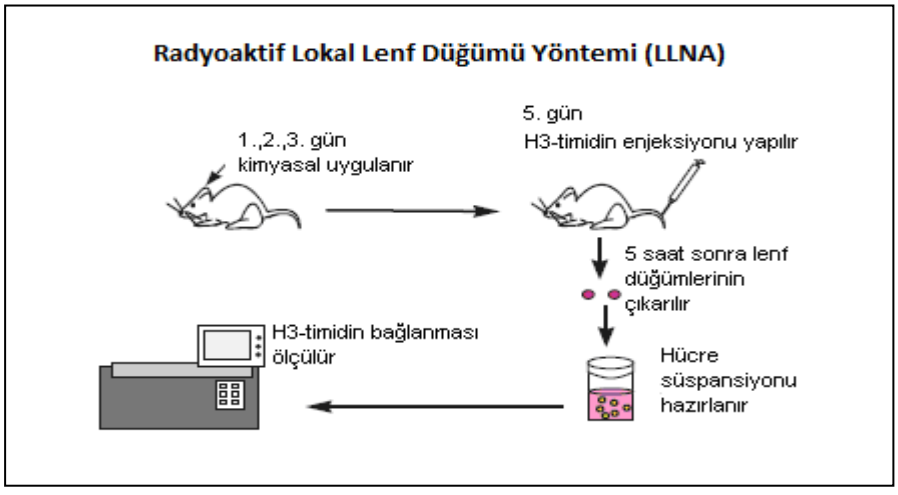
LLNA yönteminin sayısız avantajları olmasına rağmen ICCVAM raporu, iki dezavantajına dikkat çekmektedir. Birincisi, LLNA'in, [^{3}H] metil timidin kullanılarak yapılan radyoaktif bir yöntem olması, ikincisi ise antijen spesifik immün cevabın veya non-spesifik enflamatuar cevabın hücre proliferasyonuna neden olmasından dolayı irritasyon ve alerjinin tam olarak ayrılamamasıdır (ICCVAM, 1999;

Vohr ve Ahr, 2005). Ancak bu dezavantajlarına rağmen LLNA yöntemi, OECD yönetmeliğine, Nisan 2002 yılında kabul edilmiş ve bu kabulden sonra, "UK Health and Safety Executive (HSE)" yeni kimyasal maddelerin deri sensitizasyonu potansiyellerinin ölçülerek Avrupa Birliği onayını alabilmeleri için gerekli olan bir yöntem olarak göstermiştir (Cockshott ve ark., 2006). Ayrıca Avrupa'da kimyasal güvenlik konusunda en son uygulama olan REACH (Registration, Evaluation and Authorization of the Chemicals-Kimyasalların Kayıtları, Değerlendirmeleri ve İzinleri) sisteminde 30.000 kimyasaldan riskli olanların kullanımının kısıtlanabilmesi için, ECVAM kapsamında yer alan alternatif yöntemlere ihtiyaç duyulması nedeni ile LLNA testini de kimyasalların toksisitelerinin belirlenmesinde kullanılması gerekli testlerden biri haline gelmiştir ve toksikolojik risk değerlendirme çalışmaları açısından önem kazanmıştır (Kern ve ark., 2010; Kimber ve Dearman, 2010).

Deri sensitizasyonunun kazanılması, spesifik T lenfosit cevabının stimülasyonu ile olur. Bu nedenle lenf düğümlerinin çıkarılarak, lenfosit hücrelerinin proliferatif cevabının büyüklüğünün ölçülmesi LLNA testinin temelini oluşturmaktadır (Gerberick ve ark., 2007). Lenf düğümü hücrelerinin ölçümü, sadece zararlılık belirlenmesi için gerekli değil aynı zamanda zararlılık karakterizasyonu için de gereklidir. Bu nedenle lenf düğümü hücre proliferasyonunun ölçümü, test kimyasalının rölatif deri sensitizasyon potansiyelinin tespitini sağlayarak, hem risk değerlendirmesine hem de risk yönetimine katkı sağlayacaktır (Betts ve ark., 2006; Gerberick ve ark., 2007). Diğer bir faydası da prevelans ve potansiyel arasındaki ayrımının yapılabilmesine imkan vermesidir. Bu ayrım çok önemlidir çünkü yüksek prevelans her zaman yüksek potansiyel demek değildir. Önemli bir örnek, Avrupa ve Amerika Birleşik Devletleri'nde deri sensitizasyonunun en yaygın görülen sebeplerinden olan nikelin zayıf

bir alerjen olarak tespit edilmiş olmasıdır (Kimber ve ark., 2003; Betts ve ark, 2006).

Radyoaktif LLNA yöntemi (valide olmuş *in vivo* radyoaktif LLNA yöntemi) özetle şu şekildedir: Test maddesinin taşıyıcı madde içindeki belirlenen dilüsyonu veya taşıyıcı maddenin kendisi dişi CBA farelerinin her iki kulağının arkasına 25 µl olacak şekilde 3 gün boyunca uygulanır. İlk uygulamadan 5 gün sonra, kuyruk veninden ^{3}H-metil timidin enjekte edilir. 5 saat sonra kulak arkasındaki lenf düğümleri çıkarılır. ^{3}H-metil timidin bağlanması, β-sintilasyon (β-ışıldama) sayım cihazı ile ölçülür. Stimulasyon indeks (SI), test maddesinin uygulandığı gruptaki ortalama dpm/fare değerinin, taşıyıcı maddenin uygulandığı kontrol grubun dpm/fare değerine oranıdır. Pozitif cevap kabul etmek için SI değerinin 3 den büyük olması gereklidir.



Şekil 1.5. Radyoaktif Lokal lenf düğümü yönteminin şematik gösterimi (Kimber ve ark., 1994)

1.2.4.2. Radyoaktif LLNA Yöntemine Alternatif Çalışmalar

Radyoaktif işaretlemenin kullanılmasını önlemek için birçok araştırmacı, radyoaktif LLNA'ye alternatif olarak radyoaktif olmayan bazı çalışmalar da yapmıştır. Bossiquet-Leroux ve ark. (1995), farelerin lenf düğümü hücrelerinde proliferatif cevabı, bromodeoksi uridin (BrdU) kullanarak immünohistokimyasal olarak ölçmüşlerdir. Ayrıca, lenf düğümü hücrelerindeki proliferasyon flow cytometric analizler ile de ölçülmektedir (Kühn ve ark., 1995). Proliferatif cevaptan başka, B220 pozitif hücreler (Sikorski ve ark., 1996), CD3 pozitif hücreler ve CD25 pozitif hücreler, CD62L/CD44 çift pozitif hücreler (Gerberick ve ark., 1999a), CD86 pozitif hücreler ve I-A^k pozitif hücreler (Gerberick ve ark., 1999b) gibi birçok fonksiyonel yaklaşım da rapor edilmiştir. Lenf düğümü hücrelerinin alt popülasyonlarının fenotipik analizleri gibi çalışmalar da mevcuttur. Bu metodlar, flow cytometric analizlere dayanmaktadır, irritanlarla alerjenleri birbirlerinden ayırt edebilmektedirler. Th1 sitokinlerinden IL-2 (Hatao ve ark., 1995) ve IL-6 (Dearman ve ark., 1994) üretimi cRT-PCR (competitive reverse transcriptase-polymerase chain reaction) veya ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) yöntemleri ile ölçülmüştür. Sitokin üretimi güçlü alerjenlere maruziyette artmaktadır. Hariya ve arkadaşları (1999) lenf düğümü hücrelerinden salınan IL-2 düzeyinin, lenf düğümü ağırlığının ve CD4+ hücre oranının, kontakt sensitizasyonun potansiyelini ölçmek için, alternatif sonuç noktaları olarak kullanılabileceğini ileri sürmüşlerdir.

1.2.4.3. Non-Radyoaktif LLNA Çalışmaları

Birçok araştırmacı LLNA protokolünü geliştirebilmek amaçlı radyoaktif bir maddenin yöntem için gerekli olup olmadığı üzerine

yoğunlaşmıştır (Idehara ve ark., 2008; Jung ve ark., 2010; Kojima ve ark., 2011; Piccotti ve ark., 2006; Suda ve ark., 2002; Takeyoshi ve ark., 2001, 2003, 2005; Ulker ve ark., 2013). En önemli yaklaşım ise *in vivo* olarak uygulanan standart LLNA yönteminde kullanılan [^{3}H] metil timidin (3HTdR)' in nonradyoaktif bir analoğu olan 5-bromo-2-deoksiuridin (BrdU) kullanılması olmuştur (Bossiquet-Levoux ve ark., 1995). 3HTdR gibi, BrdU de hücre siklusunun S fazı sırasında artan lenfositlerin DNA' ları ile birleşir. Birçok hücresel proliferasyon yönteminde 3HTdR yerine BrdU tercih edilmiştir (Porstmann ve ark., 1985). Çünkü BrdU, 3HTdR' ye çok benzerdir ve BrdU kullanılarak yapılan varyasyon yöntemleri sonuçları standart LLNA ile çok benzerlik göstermiştir (Jung ve ark., 2010) ve uluslar arası topluluklar tarafından da onay almayı başarmıştır (ICCVAM, OECD, ECVAM gibi). 3HTdR kullanımı ile kıyaslandığında, BrdU temelli bulunan yöntem birçok avantaj sunmaktadır. Bunlar radyoaktif olmayan madde kullanılması, radyoaktif madde uygulanan hayvanların kullanımı ve yok edilmesi basamağının eliminasyonu, kontamine olmuş kafeslerin ve izole edilen lenf düğümü hücrelerinin yönetimi basamaklarının ortadan kalkması olarak sayılabilir.

Tüm bu özelliklerini göz önünde bulundurarak ICCVAM 2010 yılında LLNA:BrdU-ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)' yı kimyasalların alerji potansiyellerini ölçüm yöntemi olarak önermiştir.

Takeyoshi ve arkadaşları (2001), LLNA:BrdU-ELISA yntemini kullanarak radyoaktif olmayan BrdU ile işaretleyerek hücre proliferasyonunu ELISA yöntemi ile ölçmüşlerdir. Bu yöntem valide olmuş radyoaktif LLNA yönteminden uygulanış açısından da bir takım farklılıklar göstermektedir. LLNA yöntemine kıyasla birçok avantajı olmasına rağmen LLNA yöntemi kadar hassas olmaması nedeniyle eleştirilere de sebep olmuştur (Takeyoshi ve ark., 2006). Yöntemi kısaca özetleyecek olursak;

Dişi CBA/JN veya BALB/c fareler kullanılır, her bir grupta 4 deney hayvanı olacak şekilde gruplandırılır. 3 gün boyunca deney hayvanlarının her iki kulağının arkasına 25 µl test kimyasalı veya çözücü uygulanır. 4. gün intraperitonal BrdU enjeksiyonu (150µg/g/15µl) yapılır. 5. gün, kulak arkası lenf düğümleri çıkarılır, tartılır ve BrdU katımı ELISA yöntemi ile ölçülene kadar -20°C'de bekletilir. Ardından lenf düğümü hücreleri elde edilir ve lenf düğümü hücrelerine BrdU katımı, ticari bir hücre proliferasyon kiti ile ölçülür. Optik dansite BrdU işaretleme indeksi olarak kabul edilir. Ortalama ve standart hata değerleri her bir grup ve kontrol grubu için BrdU işaretleme indeksinden hareketle hesaplanır. Ardından Stimulasyon İndeks değerleri bulunarak istatistiksel olarak değerlendirilir (Takeyoshi ve ark., 2005).

Ulker ve arkadaşları (2011), radyoaktif LLNA yönteminden farklı olarak lenf düğümü hücrelerinin işaretlenmesini, Takeyoshi ve arkadaşlarının yaptığı gibi (2001) BrdU ile yapmıştır. Ancak Takeyoshi ve arkadaşlarının çalışmasından farklı olarak Ulker ve arkadaşları, lenf düğümlerini çıkardıktan sonra -20°C'de bekletmek yerine lenf düğümlerini çıkardıktan hemen sonra lenfosit izolasyonunu yapmış ve ardından aynı gün hücre kültürlerini elde etmişlerdir. Nonradyoaktif LLNA yönteminde ölçülen Sİ değeri 1.6 iken, Ulker ve arkadaşlarının bu uygulamalarıyla bu değer 3.0 olarak ölçülmüş, böylece yöntemin hassasiyetinin yaklaşık 2 kat arttığı görülmüştür. Ayrıca hayvan refahı gözetilerek de, intraperitoneal BrdU enjeksiyonu basamağı kaldırılmış, BrdU ile işaretleme *in vitro* olarak gerçekleştirilmiştir. Bu yöntem *ex vivo*-BrdU LLNA olarak tanımlanmaktadır.

1.2.4.4. *In vitro* Çalışmalar

1.2.4.4.1. *In vitro* Hücre Temelli Yöntemler (Human Cell Line Activation Test)

THP-1 (human monocytic leukemia cell line) hücrelerinde CD86 ve/veya CD54 ekspresyonun artmasına ve bunun flow cytometric olarak ölçümüne dayanan bir yöntemdir. EURL-ECVAM (European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing)'da prevalidasyon aşamasındadır.

1.2.4.4.2. KeratinoSens

Sensitizasyona yol açan materyalin direkt reaktivitesinin Nrf2-Keap1-ARE yolağı dikkate alınarak ölçüldüğü bir yöntemdir. Bu yolak deri sensitizasyon potansiyelinin belirlenmesinde en geçerli yolak olarak kabul edilmektedir.

1.2.4.4.3. Direkt Peptid Reaktivite Ölçümü (DPRA)

Kimyasalların proteinlerle birleşme yeteneklerinin ölçüldüğü bir yöntemdir. Araştırılan bileşiğin kimyasal aktivitesi lizin ve sistein ölçümü ile *in chemico* olarak yapılmaktadır. ESAC (European Surveillance of Antimicrobial Consumption) tarafından onaylanmıştır.

Bu yöntemlerin validasyon çalışmaları halen devam etmekte olup en az 6-7 yıl sürmesi beklenmektedir.

1.3. Alerjik Kontakt Dermatit ile İrritan Kontakt Dermatitin Karşılaştırılması

1.3.1. Mekanizma Yönünden Alerjik Kontakt Dermatit ile İrritan Kontakt Dermatitin Karşılaştırılması

İrritan kontakt dermatit kimyasal maddeye klinik cevap olarak direkt enflamasyon oluşumu ile karakterizedir ve deri hücrelerinden özellikle keratinositlerden proenflamatuar sitokin salınımı gerçekleştirerek fiziksel hasara yol açar. İrritan kontakt dermatitte birbiriyle ilişkili 3 temel patofizyolojik olay vardır. Bunlar deri bariyeri hasarı, epidermal hücre değişimi ve medyatör salınımıdır. Deri bariyeri hasarı proenflamatuar sitokin salınımına sebep olur, deri irritanları derinin doğal immünitesini aktive ederler. Proenflamatuar medyatörler T lenfositlerini aktive ederler ancak alerjik kontakt dermatitte olduğu gibi antijene özgü hafıza T hücrelerinin indüksiyonu gerçekleşmez (Ale ve Maibacht, 2010).

Çeşitli irritanların, keratinosit hücrelerde IL-1α ekspresyonunu indüklediği gösterilmiştir. IL-1α'nın aktivasyonu başka proenflamatuar sitokin ve kemokinlerin (IL-1β, TNF-α, IL-6 ve IL-8) de oluşumunu stimule etmektedir. IL-1beta-dönüştürücü enzim (ICE), aktif IL-1β oluşumuna neden olan tek enzimdir. SLS gibi irritanlara maruziyet sonucu aktif hale gelmiş keratinositlerde bu enzim kolayca ortaya çıkar. Kesin irrtitan olduğu bilinen kimyasalların oluşturduğu irritan kontakt dermatitte, ICE önemli bir patojenik adım olarak ortaya çıkar. IL-1β aktivasyonunu gerçekleştiren IL-1α ayrıca dendritik ve T hücre aktivasyonlarına da sebep olur. Bunun yanında sitokin ve kemokin salınımına, fibroblastların enflamasyonlu bölgeye göçüne ve endotelyal hücrelerdeki adhezyon moleküllerinin upregülasyonuna neden olur.

İrritan kontakt dermatitin bir diğer önemli sitokini ise TNF-α'dır. Uygulanan irritanlar sonucu deride TNF-α'nın upregüle olduğu bazı kaynaklarca rapor edilmiştir. TNF-α da yine endotelyal hücrelerdeki adhezyon moleküllerini upregüle etmesinin yanında IL-1,IL-6, IFN-γ, IL-8 gibi enflamatuar medyatörlerin indüksiyonuna neden olur (Lee ve ark., 2013).

Çeşitli irritanlara maruziyet sonucu salınan IL-6'nın da, deri enflamasyonunun devam etmesi için önemli bir rol oynadığına inanılır. Özellikle irritanların tekrarlayan dozlarda uygulanması sonucu ortaya çıkan IL-10 ve IL-1 reseptör antagonistleri de enflamasyona neden olur (Lee ve ark., 2013).

İrritasyonun aksine alerjik kontakt dermatit sonradan kazanılmış immün yanıttır. T hücre odaklı gecikmiş tip alerjik cevap olarak ortaya çıkar. Teorik olarak deri proteinleriyle kovalent bağlanabilen herhangi bir kimyasal, bu tip alerjiye sebep olabilir. İlk etapta immün cevap indüklenir ve kişi duyarlı hale gelir. Fakat hastalık ortaya çıkmaz. Tekrarlanan etkin dozda deride reaksiyon gözlenir ve alerjik kontakt dermatit adını alır.

Alerjik kontakt dermatit kazanılmış immüntenin aktive olduğu bir reaksiyondur. Bu tip kontakt dermatit fragrans, prezervatif, kauçuk, endüstriyel ajanlar, epoksi reçineleri, akrilatlar, ilaçlar ve diğer birçok kimyasala maruziyet sonucu oluşabilir. İki basamaklı bir mekanizmadır. İlk olarak sensitizasyon (duyarlanma) fazı gerçekleşir, ikinci olarak ortaya çıkma fazı görülür.

Son yıllarda yapılan çalışmalar alerjik kontakt dermatit cevabında hem IFN-γ'nın hem IL-17'nin arttığını göstermektedir. Ayrıca Th2 sitokinlerinden IL-4 ve IL-10 un olaya dahil olduğuna dair çalışmalar da vardır. Her iki dermatit tipinde de benzer efektör yolları paylaşıldığı

ve bazı benzer sitokin ve kemokinler olaya dahil olduğu için dermatit toksisite profilleri benzerlik göstermektedir. Çok güçlü alerjenlerin aynı zamanda irritan özellikleri olması sebebiyle alerjik kontakt dermatite irritasyonun da dahil olması söz konusu olabilir (Ale ve Maibacht, 2010).

İrritan kontakt dermatit ile alerjik kontakt dermatit arasında patolojik farklılıklar olmasının yanında, histopatolojik (hücresel salınımlar, vazodilatasyon) ve moleküler özelliklerde de (örneğin; sitokin/kemokin salınımı, endotelyal adhezyon molekül salınımı gibi) değişiklikler vardır. Erken evrede, irritan kontakt dermatit ve alerjik kontakt dermatitin her ikisine de doğal immün cevap olarak IL-1 ve TNF-α salınımı gerçekleşir. İleri evrede ise irritan kontakt dermatitte deri enflamasyonu halen doğal immün cevaplara bağlı iken alerjik kontakt dermatitte ise oluşan enflamasyonu artırmak amaçlı antijen-spesifik T hücreleri olaya dahil olur (Lee ve ark., 2013).

1.3.2. Klinik Olarak Alerjik Kontakt Dermatit ile İrritan Kontakt Dermatitin Karşılaştırılması

Klinik uygulamalarda alerjik kontakt dermatit ve irritan kontakt dermatit ayrımını yapmak oldukça zordur. Kontakt dermatit tanısı hastanın öyküsüne, klinik verilerine, maruziyet değerlendirmesine (maruz kalınan kimyasalın tespiti, dermal temas süresi ve risk karakterizasyonu), yatkınlığının değerlendirilmesine bağlı olarak değişir.

Alerjik kontakt dermatit ve irritan kontakt dermatit arasındaki bir diğer fark da irritan kontakt dermatit reaksiyonlarının özellikle ilk maruziyette bile dakikalar içerisinde gerçekleşmesidir. Alerjik kontakt dermatitte ise ortaya çıkma zamanı genellikle maruziyetten 24-72 saat

sonradır. Ayrıca ilk maruziyette duyarlı hale gelmiş bireylerde yıllar sonra bile aynı maddeye maruziyet sonucu alerjik kontak dermatit gelişebilir.

Klinik olarak farkları aşağıdaki çizelgede özetlenmiştir:

Çizelge 1.3. Klinik olarak alerjik kontakt dermatit ile irritan kontakt dermatitin karşılaştırılması (Ale ve Maibacht, 2010)

İrritan Kontakt Dermatit	**Alerjik Kontakt Dermatit**
Morfoloji	
Akut irritan kontakt dermatit eritem, ödem ve bazen vezikül, bul ve püstül görünümlüdür. Nekroz ve ülserasyon korozif materyallerle görülebilir. İrritan kontakt dermatit çoğunlukla deride kuruluk ve pürüzlü yapıya neden olur. Kronik irritan kontakt dermatit hiperkeratinozis, pullanma, liken oluşumu, çatlak şeklinde görülebilir. Oluşan lezyonlar temas alanıyla sınırlıdır.	Alerjik kontakt dermatitte püstüller, nekroz ve ülserasyon çok nadir görülür. Alerjik kontakt dermatit genellikle ödem ve veziküle karakterizedir. Klinik lezyonlar temas alanında daha şiddetlidir fakat hastalık şiddeti lezyonların bu bölgeyi aşmalarına göre belirlenir. Dermatit lezyonlarından yakın bölgelere bulaşma görülebilir.
Semptomlar	
Deride yanma, acı, sızlama, batma, ağrı görülür. Kaşıntı oluşabilir.	Temel semptomu kaşıntıdır.
Klinik Değerlendirme	
Akut irritan kontakt dermatit ilk maruziyet sonrasında hemen oluşur. Akut irritan kontakt dermatitte lezyonlar genellikle dakikalar içinde çok hızlı biçimde oluşur. Fakat gecikmiş reaksiyonlar da görülebilir. İrritan reaksiyonlar '*dekreşendo fenomeni*' ile karakterizedir. Reaksiyon hızlıca pik yapar ve sonrasında iyileşmeye başlar.	Ortaya çıkması için duyarlanma maruziyeti gereklidir. Klinik lezyonlar, antijene özgü hafıza T hücrelerinin sunumu ile bağışıklık kazanılmasından sonra ortaya çıkar. Lezyonlar genellikle son maruziyetten 24-72 saat sonra ortaya çıkar. Fakat maruziyetten sonra en erken 5 saat, en geç 7 gün sonra da lezyon gelişimi olabilir. Alerjik reaksiyonlar '*kreşendo fenomeni*' ile karakterizedir.



Şekil 1.6. Ellerde oluşmuş alerjik kontakt dermatit



Şekil 1.7. Hint kınasının neden olduğu irritan kontakt dermatit

1.3.3. Alerjik Kontakt Dermatit ile İrritan Kontakt Dermatitinin Ayrımında Kullanılan Yöntemler

1.3.3.1. Klinikte Uygulanan Yama Testi (Patch Test)

Alerjik kontakt dermatitli hastalarda etiyolojik ajanın saptanması, hastalığın sağaltımında ve tekrarının önlenmesinde önemlidir. Bu nedenle yama testi yaygın olarak kullanılmaktadır. İlk kez Jadassohn'nun tanımladığı ve daha sonra Bloch tarafından kullanıma sunulan yama testi, kişinin test edilen maddeye karşı duyarlılığını göstermektedir. Yama testi uygulamalarında dikkat edilmesi gereken en önemli noktalar; temas alerjeninin uygun konsantrasyon ve taşıyıcıda hazırlanması, test bölgesi, yama büyüklüğü, oklüzyonun sağlanması, uygulama süresi ve testin değerlendirilmesidir. Uygulamada olan farklılıklar ve farklı değerlendirmeler yanlış sonuçlara neden olabilmektedir. Bu nedenle bugün yama testi standardize edilmiş kurallarla yapılmaktadır. Buna göre hastalara uygulanan yama testi 48. saatte açılır, 30 dakika bekledikten sonra ilk değerlendirmesi yapılan hastalar test yapıldıktan sonraki 96. saatte ikinci kez değerlendirilir. 48. saatte pozitif olup, 96. saatte negatifleşen veya azalan reaksiyonlar irritan olarak kabul edilir. 48. saatte pozitifleşerek 96. saatte artan veya 96. saatte ortaya çıkan reaksiyonlar pozitif alerjik reaksiyon olarak değerlendirilir (Marks ve ark., 2000).

Test sonuçları;
Reaksiyon yok ise “negatif” (-)
Eritematöz papüller “bir pozitif” (1+),
Veziküller “iki pozitif” (2+)
Krut veya ülserasyon ile birlikte yayılım gösteren reaksiyon “üç pozitif” (3+) olarak yorumlanır.

1.3.3.2. % Kulak Kalınlığı Artışı

Bu yöntem; ex vivo BrdU:LLNA-ELISA testinin esaslarına göre yürütülür. Ondan farklı olarak lenf düğümü proliferasyonunun değerlendirilmesi yapılmaz ve her bir doz grubunda daha az hayvan kullanılır. Her bir doz grubu için bir veya iki hayvan önerilir. Her gün bütün fareler sistemik toksisite, uygulama bölgelerinde lokal irritasyon ve eritema açısından klinik olarak gözlenir. Farelerin kulak kalınlıkları; uygulama öncesi 1. gün, ilk uygulamadan yaklaşık 48 saat sonra 3. gün ve 6. gün dijital mikrometre ile ölçülür. 6. gün hayvanlar en uygun ötenazi yöntemi ile öldürüldükten sonra kulak kalınlıkları tespit edilir. Aşırı lokal irritasyon, eritema skorunun 3'ten büyük oluşu ve/veya kulak kalınlıklarında %25 artış ile belirlenir (OECD, 2010).

1.3.3.3. Ayrım İndeksi (Differentiation index)

Kimyasalların alerjik veya irritan potansiyallerinin ayrımını yapmak için, lenf düğümü aktivasyonunun rölatif derecesi, deri enflamasyonunun rölatif derecesi ile kıyaslanır. Öncelikle maksimum kulak kalınlığı (15 x 0.01 mm) ve maksimum LN indeks (5) tanımlanmıştır. Bu değerler güçlü irritan maddeler (kroton yağı, sodyum lauril sülfat) ve çok güçlü alerjen maddelerin (oxazolon, dinitroflorobenzen) uygulandığı 50 kadar deney sonucunda ortaya konmuştur. Kulak kalınlığındaki maksimum değişimin yüzdesi ve hücre sayısındaki maksimum değişim yüzdesi değerleri aşağıdaki formüllerden hesaplanır. Ayrım indeksi bu yüzdelerin birbirine oranıdır. Kimyasal madde için hesaplanan ayrım indeksi 1'den küçük bulunursa irritan potansiyele sahip olduğu, ayrım indeksi 1'den büyük bulunursa alerjik potansiyele sahip olduğu şeklinde yorum yapılır. Çünkü 1'den büyük çıktığı durumlarda lenf düğümü hücre

sayısındaki artış, deride oluşan enflamatuar reaksiyonun bir göstergesi olan kulak kalınlığındaki artıştan daha baskındır (Homey ve ark., 1998).

$$\text{Lenf düğümü hücresindeki \% artış} = \frac{\text{LN index-1}}{4} \times 100$$

$$\text{Kulak kalınlığındaki \% artış} = \frac{\text{Kulak kalınlığı (mm)}}{15 \times 0.01 \text{ mm}} \times 100$$

$$\text{Ayrım indeksi} = \frac{\text{Lenf düğümü hücresindeki \% artış}}{\text{Kulak kalınlığındaki \% artış}}$$

Kimyasal madde;
Ayrım indeksi <1 ise, irritan potansiyel
Ayrım indeksi > 1 ise, alerjik potansiyel olarak değerlendirilir.

1.4. *Ex vivo* BrdU:LLNA-ELISA yöntemi ile irritasyon ve alerji potansiyelleri tespit edilecek olan ve kozmetik formülasyonlarda kullanılan kimyasal maddeler

1.4.1. Sodyum lauril sülfat (SLS)

Sodyum lauril sülfat özellikle kişisel bakım, kozmetik ve temizlik ürünlerinde kullanılan sarımsı pasta veya sıvı formlarında bulunan, deterjan ve surfaktan etkileri olan bir kimyasaldır. Aslında SLS olarak adlandırılsa da ABD İnsan ve Sağlık Hizmetleri Bölümü Ev Ürünleri veritabanı (U.S. Department of Health & Human Services Household Products) ve Çevre Çalışma Grubu Deri Kozmetikleri veritabanında

(Environmental Working Group's Skin Deep Cosmetics) birden fazla isimle yer almaktadır.

Kozmetik preparatlarda SLS köpük oluşturucu, temizleyici ve yağdan arındırıcı olarak görev yapar. Yani kullanılan bir ürün fazlaca köpürüyorsa içerisinde SLS olma ihtimali çok yüksektir. Henüz kullanımına herhangi bir kısıtlama gelmeyen SLS, şampuanlar, yüz ve makyaj temizleyiciler, sıvı sabun, duş jeli, banyo köpükleri ve diş macunları gibi birçok kişisel bakım ürünlerinde yüksek dozlarda oldukça yaygın şekilde kullanılmaktadır. Amerika'da SLS kullanım kontrolleri, bir kozmetik preparatta kullanılacaksa ABD Gıda ve İlaç Dairesi (U.S. Food and Drug Administration (FDA)) tarafından, temizlik ürünlerinde kullanılacaksa Çevre Koruma Ajansı (Environmental Protection Agency (EPA)) tarafından yapılmaktadır (http://greencleaning.about.com/od/GreenCleaningResources/g/Sodium-Laureth-Sulfate-What-It-Is-How-It-S-Used-And-More.htm).
Surfaktanlar, deri bariyeri fonksiyonunu birkaç mekanizma yoluyla etkilerler. Bunlardan biri stratum korneum tabakasındaki protein ve lipit yapılarına zarar vermektir. Surfaktanların yüzey yükü ve partikül büyüklükleri hasar ihtimallerini artıran faktörlerdir ve en yüksek hasara neden olan maddeler anyonik surfaktanlardır. Partikül büyüklüğü 2.9 nm olan SLS de bir anyonik surfaktandır (Moore ve ark., 2003).

Herhangi bir dermatolojik hastalık öyküsü bulunmayan 20 kadın gönüllü (18-65 yaş aralığında) üzerinde 24 saat süreli % 1 SLS yama testi yapılmıştır. Sadece su uygulanarak oluşturulan kontrol grubu ile karşılaştırıldığında SLS uygulanan bireylerin uygulama bölgesinde transepidermal su kaybı, kızarıklık ve eritema oluştuğu gözlenmiştir (Hoffman ve ark., 2014). Şu an piyasadaki kişisel bakım, kozmetik ve temizlik ürünlerinde bulunan SLS kullanımına kısıtlama getirilmeye

çalışılsa da, birçok yan etkisine rağmen temizleyici olarak kullanılmaya devam etmektedir.

1.4.2. Kroton yağı

Kroton yağı, *Croton tiglium* L. (Euphorbiaceae) türünün olgun tohumlarından elde edilen bir yağdır. Bu tür özellikle Hindistan'da yetişen küçük bir ağaçtır. Olgun tohumların soğukta sıkılması ile %50-60 oranında kroton yağı elde edilmektedir. Kroton yağı esmerimsi sarı renklidir. Kıvamlı ve hoş olmayan bir kokuya sahiptir ve yakıcı bir tadı vardır. Dahili olarak müshil amaçlı kullanıldıysa da ölümcül sonuçlara neden olabileceğinden kullanımı kısıtlanmıştır. Ayrıca kroton yağının direkt karsinojen etkisi olmamasına rağmen kanser oluşumunda kokarsinojen etkili olduğu bilinmektedir.

Kroton yağı birkaç bileşenden oluşmuş basit bir karışımdır. Yaşa bağlı olarak irritan özellikleri çeşitlilik göstermektedir. Tonelli ve arkadaşları (1965) bazı bileşiklerin anti-enflamatuar aktivitelerini belirleyebilmek için kulaklarda ödem oluşturmak amacıyla kroton yağı kullanmışlardır. Kroton yağı ratların kulak arkalarına topikal olarak uygulandığında 6 saat sonra değerlendirilebilen akut bir enflamasyon oluşturduğu gözlenmiştir (Ga´bor, 2002). Farelerin kulaklarında kroton yağı kullanılarak oluşturulmuş ödem modeli, anti-enflamatuar steroidlerin ve nonsteroid ajanların topikal etkilerini değerlendirmek için kullanılmıştır. Kroton yağı ile indüklenmiş kulak enfeksiyonunda araşidonik metabolitlerinin (özellikle PGE2) ve diğer medyatörlerin indüklenmesi sonucu klasik ödem reaksiyonları gelişir. Deride vazodilatasyon, infiltrasyon ve plazma sızıntısı görülür (de Bernardis ve ark., 1994).

Kroton yağı uygulanarak farelerin kulaklarında oluşan enflamatik reaksiyonlarda konsantrasyona ve maruziyet süresine bağlı olarak deride IL-1β salınımı görülmüştür (Towbin ve ark., 1995).

1.4.3. Dinitroklorobenzen (DNCB)

Yüksek bir alerjen özelliğe sahip olduğu bilinen DNCB, araştırmamızda bulunan diğer alerjen kimyasallar için pozitif kontrol amaçlı kullanılmıştır. Günümüzde sıkça kullanılmamakla birlikte, nadiren de olsa Human papilloma viruslar tarafından deri ve mukozalarda oluşturulan verruka olarak adlandırılan iyi huylu tümöral lezyon (siğil) tedavisinde kullanılmaktadır (Saçar ve Saçar, 2013).

1.4.4. İzoöjenol

İzoöjenol bir fragrans materyali olarak parfümlerde ve parfümlü ürünlerde kullanılmaktadır. Sıklıkla kontakt alerjiye sebep olan güçlü bir deri alerjenidir (Schnuch ve ark., 2004). 20 yıldan uzun bir süredir Avrupa Baseline Serisi'nde yer alan izoöjenol, fragrans karışımındaki 8 maddeden biridir ve önemli bir kişisel alerjendir (Larsen, 1977). Fragrans karışımı, 7 tanesi sentetik, 1 tanesi doğal olmak üzere 8 farklı içerikten oluşmaktadır (Johansen, 2003).

Çizelge 1.4. Fragrans karışımının içeriğindeki maddeler

Fragrans karışımı içeriği	**Miktarı**
Oak moss absolut (doğal)	%1
İzoöjenol	%1
Öjenol	%1
Sinnamik aldehit	%1
Hidroksisitronellal	%1
Geraniol	%1
Sinnamik alkol	%1
Alfa-amil sinnamik aldehit	%1

1980'den beri Uluslararası Fragrans Derneği (the International Fragrance Association (IFRA)), kozmetiklerde izoöjenol kullanımını maksimum 2000 p.p.m (0,2%) olarak sınırlandırmıştır. Fakat 1998'de alerjenik özellikleri nedeniyle bu sınır 200 p.p.m. (0,02%)' e düşürülmüştür (Rastogi ve Johansen, 2008). Londra St. John's Dermatoloji Enstitüsü'nde 3636 hasta arasında yakın zamanda yapılan bir çalışmada, 2001'den 2005'e kadar olan 5 yıllık dönemde izoöjenol kontakt alerjisinde istatistiksel olarak önemli bir artış olduğu gözlenmiştir (White ve ark., 2007). Bunun sebebinin ise izoöjenol kullanımının kısıtlanmış olmasına rağmen artık izoöjenolün yerini yine alerjik reaksiyonlar gösteren izoöjenol türevlerinin almış olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir ve bu türevlerin kozmetiklerde kullanımı için henüz herhangi bir kısıtlama getirilmemiştir (Tanaka ve ark., 2004).

1.4.5. Öjenol

Öjenol, karanfil yağından elde edilir. Sarı, renksiz ya da soluk renkli bir sıvıdır. Havayla temas ettiğinde kararır ve yoğunlaşır. Karanfil gibi kokar. Pratikte suda çözünmeyen öjenol; alkol, kloroform, eter ve yağlarda çözünür. Diş hekimliğinde kanal tedavisinde geçici dolgu maddesi olarak çok kullanılır. Piyasada bu amaçla kullanmak için çinko oksitle karıştırılmak üzere likit ya da toz halinde hazır preparatları bulunmaktadır.

Öjenol de izoöjenol gibi fragrans karışımı içerisinde bulunan 8 maddeden biridir. Fragrans materyali olarak parfümlerde veya parfümlü kozmetiklerde kullanılmaktadır. Ürünlerde kullanılan öjenolün konsantrasyonuna bağlı olarak alerjik reaksiyon oluşturma riski artmakla birlikte, farelerde yapılan LLNA sonuçlarına göre uygulanan %10-%25 konsantrasyonları arasında ölçülen SI değerinin 1'den 7.2' ye kadar yükseldiği gözlenmiştir (Piccotti ve Kawabata, 2008).

1.4.6. Paraaminobenzoik asit (PABA)

Sonuçların değerlendirilebilmesi amacıyla negatif kontrol olarak kullanılan PABA, ilk zamanlar güneşten korunma maksadıyla kullanılsa da günümüzde de hem topikal hem de oral kullanımı vardır. Oral kullanım için piyasada kapsül halinde bulunmakta iken, beyazlayan saçların eski rengini alabilmesi amacıyla bazı saç boyalarında kullanılmaya başlanmıştır. Alerji ya da irritasyon yapıcı etkileri bulunmadığı için sonuçların değerlendirilmesi amacıyla uyguladığımız yöntemde negatif kontrol olarak kullanılmıştır.

1.4.7. Aseton:zeytin yağı (4:1 h/h)

Açıklanan yöntemde en uygun çözücü olarak hem hayvan refahı hem de kullanılan maddelerin içerisinde en iyi şekilde çözünebilmeleri dikkate alınarak aseton:zeytin yağı (4:1 h/h) kullanılmıştır.

1.5. Tez Projesinin Konusu ve Amacı

Kozmetik formülasyonlarda bulunan ve irritan maddeler olduğu bilinen **sodyum lauril sülfat (SLS)** ve **kroton yağı (croton oil)** maruziyetlerinin, alerjen maddeler olan **dinitroklorobenzen (DNCB), izoöjenol ve öjenol** maruziyetleri ile karşılaştırılarak alerjik ve irritan kontakt dermatit oluşturma potansiyellerinin değerlendirilmesi projenin konusunu oluşturmaktadır. Bu değerlendirmenin yapılabilmesi için çalışmamızda, Prof. Dr. Asuman Karakaya tarafından yönetilen bir TÜBİTAK projesi kapsamında Dr. Ülker'in doktora tezinde (Ulker, 2010) modifiye edilen, *ex vivo* BrdU:LLNA-ELISA yöntemi kullanılmıştır. Negatif kontrol olarak **paraaminobenzoik asit (PABA)** ve belirtilen bu maddelerin **aseton:zeytin yağı (4:1 h/h) (aseton:olive oil, AOO)** içerisinde çözünmeleri sağlanarak, bu çözeltiler deney hayvanlarına topik olarak uygulanmak üzere her uygulama öncesi taze olarak hazırlanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. *Ex vivo* BrdU:LLNA-ELISA protokolü

2.1.1. Kimyasallar

Topik uygulanan irritan maddeler:

SLS (Prolab, Belçika)

Çözücü: aseton (Riedel-de Haen, Almanya):zeytinyağı (Sigma-Aldrich, Almanya) (4:1) (AOO) (hacim/hacim)

Uygulanan konsantrasyonlar: %0,05; %0,1; %0,25; %0,5 (ağırlık/hacim)

Kroton Yağı (Sigma, ABD)

Çözücü: aseton (Riedel-de Haen, Almanya):zeytinyağı (Sigma-Aldrich, Almanya) (4:1) (AOO) (hacim/hacim)

Uygulanan konsantrasyonlar: 0,05; %0,1; %0,25; %0,5 (ağırlık/hacim)

Topik uygulanan alerjen maddeler:

DNCB (Sigma, Almanya)

Çözücü: aseton (Riedel-de Haen, Almanya):zeytinyağı (Sigma-Aldrich, Almanya) (4:1) (AOO) (hacim/hacim)

Uygulanan konsantrasyonlar: %0,025; %0,05; %0,1; %0,25 (ağırlık/hacim)

İzoöjenol (Acros organics, ABD)

Çözücü: aseton (Riedel-de Haen, Almanya):zeytinyağı (Sigma-Aldrich, Almanya) (4:1) (AOO) (hacim/hacim)

Uygulanan konsantrasyonlar: %0,5; %1; %5; %10 (ağırlık/hacim)

Öjenol (Acros organics, ABD)

Çözücü: aseton (Riedel-de Haen, Almanya):zeytinyağı (Sigma-Aldrich, Almanya) (4:1) (AOO) (hacim/hacim)

Uygulanan konsantrasyonlar: %2,5; %10; %20; %50 (ağırlık/hacim)

Topik uygulanan negatif kontrol maddesi:

PABA (Sigma, ABD)

Çözücü: aseton (Riedel-de Haen, Almanya):zeytinyağı (Sigma-Aldrich, Almanya) (4:1) (AOO) (hacim/hacim)

Uygulanan konsantrasyonlar: %1; %2,5; %5; %10 (ağırlık/hacim)

Diğer Kimyasallar:

Fötal Bovine Serum (Biological Industries, İsrail)

Penisilin-Streptomisin (Biological Industries, İsrail)

Glutaminli RPMI 1640 (Sigma, ABD)

PBS (Fosfat tampon çözeltisi)(Sigma, ABD)

Fitohemaglütinin (PHA) (Biochrom, Almanya)

Bromodeoksi uridin (BrdU) (Sigma, Almanya)

Tripan mavisi (Biological Industries, İsrail)

BrdU-hücre proliferasyonu kiti (Roche, Almanya)

Mouse IL-1 ELISA kiti (Bender MedSystems, ABD)

Mouse IL-2 ELISA kiti (Bender MedSystems, ABD)

Mouse IL-4 ELISA kiti (Bender MedSystems, ABD)

Mouse IL-5 ELISA kiti (Bender MedSystems, ABD)

Mouse IFN-γ ELISA kiti (Bender MedSystems, ABD)

Mouse TNF-α ELISA kiti (Bender MedSystems, ABD)

2.1.2. Kullanılan Alet ve Malzemeler

Dijital mikrometre (Mitutoyo, Japonya)
%5 CO_2'li, su ceketli inkübatör (Sanyo, Japonya)
Vorteks (Nüve NM110, Türkiye)
Otomatik otoklav (Sanyo, Japonya)
Laminar air flow (Clean Air, Biohazard EN 12469)
Mikroskop (CETİ, Belçika)
Soğutmalı santrifüj (Sigma, ABD)
Terazi (Sartorius, Almanya)
Otomatik pipet (Jencons, ABD)
Çok kanallı otomatik pipet (Ependorf, Almanya)
Membran filtre (0,20 µm, Sartorius, Almanya)
Steril tüpler (Grenier bio-one, Almanya)
Steril petri kabı (Grenier bio-one, Almanya)
Steril 24 kuyucuklu plak (Grenier bio-one, Almanya)
Steril 96 kuyucuklu plak (Grenier bio-one, Almanya)
Neubauer lamı (Marienfeld, Almanya)
Otomatik ELISA yıkayıcısı (Rayko, Çin)
ELISA plak okuyucusu (SpectraMAX, Molecular Devices Inc., ABD)
Fare kafesi (Ebeco, Almanya)

2.1.3. Deney hayvanı

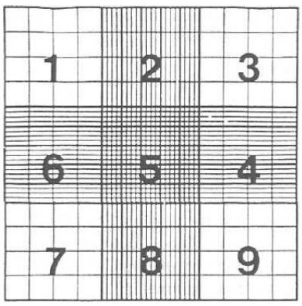
Ankara Üniversitesi Hayvan Etik Kurulundan onay alındıktan sonra çalışmalara başlandı. Deney hayvanı olarak 8-12 haftalık dişi BALB/c fareler kullanıldı. Fareler, Gülhane Askeri Tıp Akademisi Araştırma ve Geliştirme Merkez Başkanlığı, Deney Hayvanları Bölümü'nden temin edildi. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Deney Hayvanları Ünitesi'nde 23°C' de, %55 nem oranına sahip, 12 saat gece

ve 12 saat gündüz koşullarını sağlayan bir ortamda barındırıldı. Fareler fare yemi (Optima, Turkiye) ve su ile beslendi.

2.1.4. Lenfosit proliferasyonunun lenf düğümü hücrelerinde BrdU ile *ex vivo* olarak ölçülmesi

Hayvan refahı göz önünde bulundurulduğunda, travmatik bir uygulama olan BrdU'nin i.P. enjeksiyonun yapıldığı *in vivo* yöntem yerine ex vivo lenfosit proliferasyonu ölçüm çalışmaları yapıldı ve maddelerin özelliklerine göre alerji ve irritasyon sonuçları değerlendirildi.

- Deney hayvanları her bir konsantrasyon grubunda 4 adet olacak şekilde gruplandırıldı. 4 farklı konsantrasyona ait 4 farklı grup oluşturuldu.
- Kulak kalınlıkları dijital mikrometre ile ölçüldü.
- Yukarıda belirtilen bu maddelerin belirlenen konsantrasyonları 3 gün boyunca farelerin kulak arkalarına 25 µL olacak şekilde topik olarak uygulandı.
- 4. gün deney hayvanları dinlendirildi.
- 5. gün servikal dislokasyon işlemi ile deney hayvanları öldürüldü ve kulak kalınlıkları ölçüldü.
- Her bir hayvanın iki lenf düğümü de steril koşullarda laminar airflowda çıkartıldı ve steril petri kaplarına aktarılarak tartıldı. Soğuk PBS içeren tüplere konuldu. Homojenizatör ile düşük devirde parçalandı, açığa çıkan hücreler PBS ile iki kez yıkandı ve dipte kalan lenfosit süspansiyonu 1 mL ye tamamlandı.
- 1 ml' lik lenfosit çözeltisinden 25 µl alındı ve üzerine 25 µl tripan mavisi eklendi, karıştırıldı. Dilüsyon faktörü 2'dir. Neubauer sayım lamı üzerine alınan lenfosit çözeltisi tripan mavisi karışımının üzeri lamel ile kapatıldı ve lenfositlerin canlılığını yitirmemesi için hemen sayım yapıldı.



1, 3, 5, 7 ve 9 numaralı karelerdeki hücreler sayıldı. Sayılan 5 karedeki hücrelerin ortalaması alındı, dilüsyon faktörü ve 10^4 ile çarpılarak 1 ml'deki hücre sayısı hesaplandı.

$$\frac{\text{Toplam hücre sayısı}}{5} \times 10^4 \times 2 = \text{1 ml'deki hücre sayısı.}$$

96-kuyucuklu hücre kültürü plaklarına, PBS, penisilin-streptomisin, fitohemaglutinin içeren glutaminli RPMI-1640 kültür ortamına 10^5 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekim yapıldı. %5 CO_2 içeren 37°C sıcaklıktaki etüve kaldırıldı. 48. saat sonunda BrdU her bir kuyucuğa eklendi. 20 saat daha beklendikten sonra hücre ortamı etüvden alındı, 300 g de 10 dk santrifuj edilerek lenfositlerin dibe çökmesi sağlandı. Üst faz uzaklaştırıldı. 60°C sıcaklıkta 1 saat bekletildi ve kurutuldu. 200 µL Fix-Denat çözeltisi ilave edildi ve 30 dk karanlıkta bekletildi. İnkübasyondan sonra plak ters çevrildi, Fix-Denat çözeltisi uzaklaştırıldı. Kuyucuklara 100 µL Anti-BrdU çalışma çözeltisi eklendi 90 dk bekletildi. 90 dakikadan sonra plak ters çevrildi, çözelti uzaklaştırıldı ve 3 kez yıkama çözeltisi ile yıkama işlemi yapıldı. Yıkamanın ardından kuyucuklara 100 µL substrat çözeltisi eklendi. Plak oda ısısında karanlıkta 30 dakika bekletildikten sonra 25 µL stop çözeltisi eklendi ve hemen 450 nm'de ELISA-okuyucuda okutuldu. Optik dansite değerleri ölçüldü (OD_{450}).

2.1.5. Stimülasyon indeksinin (SI) bulunması

Lenfosit proliferasyonu ELISA kiti ile ölçüldükten sonra, BrdU ile işaretleme indeksi olarak optik dansite kabul edildi. Her bir grup ve kontrol grubu için ortalama optik dansite değerleri alındıktan sonra aşağıdaki şekilde Sİ değeri hesaplandı.

$$Sİ = \frac{\text{Test kimyasal maddesinin ortalama optik dansite değeri}}{\text{Çözücünün ortalama optik dansite değeri}}$$

2.1.6. Kulak kalınlığındaki % artış hesaplanması

Her gün bütün fareler sistemik toksisite, uygulama bölgelerinde lokal irritasyon ve eritema açısından klinik olarak gözlendi. Farelerin kulak kalınlıkları; uygulama öncesi 1. gün, ilk uygulamadan yaklaşık 48 saat sonra 3. gün ve 5. gün dijital mikrometre ile ölçüldü. 5. gün hayvanlar servikal dislokasyon yöntemi ile öldürüldükten sonra kulak kalınlıkları tespit edildi. Aşırı lokal irritasyon, kulak kalınlıklarında %25 artış ile belirlendi.

2.1.7. Ayrım indeksinin bulunması

Kulak kalınlığındaki maksimum değişimin yüzdesi ve hücre sayısındaki maksimum değişim yüzdesi değerleri aşağıdaki formüllerden hesaplanır. Ayrım indeksi bu yüzdelerin birbirine oranıdır. Kimyasal maddeleri deney hayvanlarının kulak arkalarına uygulamaya başlamadan önce ve 5. gün kulak kalınlıkları ölçüldü. Hazırlanan hücre süspansiyonları Tripan mavisi ile boyanarak Neubeuer lamı ile lenfosit sayımı yapıldı, mL deki hücre sayısı hesaplandı. Lenf düğümü hücre sayısı indeksi (LN indeks), test materyali uygulanan farelerin ortalama lenf düğümü hücre sayısının, sadece çözücü uygulanan farelerin ortalama lenf düğümü hücre sayısına oranı şeklinde hesaplandı. Aşağıdaki formül yardımıyla (Homey ve ark., 1998) ayrım indeksi bulundu.

$$\text{Lenf düğümü hücresindeki \% artış} = \frac{\text{LN index-1}}{4} \times 100$$

$$\text{Kulak kalınlığındaki \% artış} = \frac{\text{Kulak kalınlığı (mm)}}{\text{15 x 0.01 mm}} \times 100$$

$$\text{Ayrım indeksi} = \frac{\text{Lenf düğümü hücresindeki \% artış}}{\text{Kulak kalınlığındaki \% artış}}$$

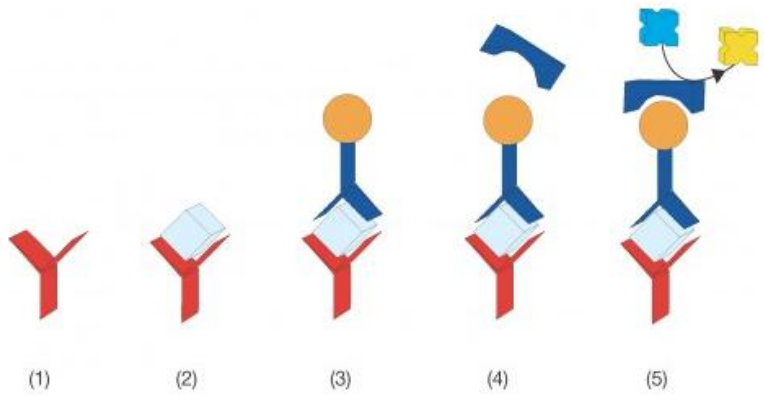
Kimyasal madde;
Ayrım indeksi <1 ise, irritan potansiyel
Ayrım indeksi > 1 ise, alerjik potansiyel olarak değerlendirilir.

2.1.8. *Ex vivo* BrdU katım yöntemi uygulanarak elde edilen lenfosit kültürlerinde sitokin düzeylerinin ölçümü

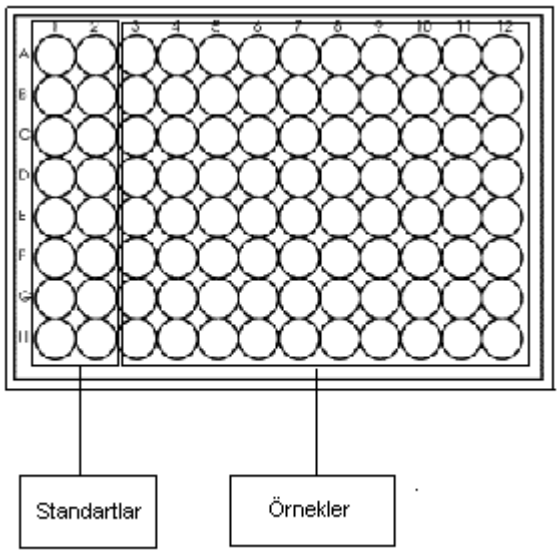
- Yukarıda *ex vivo* yöntemde belirtildiği gibi deney hayvanları her bir konsantrasyon grubunda 4 adet olacak şekilde gruplandırıldı. 4 farklı konsantrasyona ait 4 farklı grup oluşturuldu ve kimyasallar topik olarak uygulandı.
- 5. gün servikal dislokasyon işlemi ile deney hayvanları öldürüldü. Her iki lenf düğümü de steril koşullarda laminar airflowda çıkartıldı ve steril petri kaplarına aktarılarak tartıldı.
- Soğuk PBS içeren tüplere konuldu. Homojenizatör ile düşük devirde parçalandı açığa çıkan hücreler PBS ile iki kez yıkandı ve dipte kalan lenfosit süspansiyonu 1 mL ye tamamlandı. Tripan mavisi

ile boyanarak Neubeuer lamı ile lenfosit sayımı yapıldı, mL deki hücre sayısı hesaplandı.

- Lenfositler tarafından salınan sitokin analizi için, PBS, penisilin-streptomisin, fitohemaglutinin içeren ve içermeyen glutaminli RPMI-1640 kültür ortamına mL de $5x10^6$ hücre olacak şekilde 24-kuyucuklu hücre kültürü plaklarına ekim yapıldı. %5 CO_2 içeren 37°C sıcaklıktaki etüve kaldırıldı. 72. saatin ardından 24-kuyucuklu plaklar 150 g de 5 dk santrifuj edildi, supernatant kısmı 4 farklı ependorfa bölündü ve -80°C lik derin dondurucuya ELISA ile yapılacak sitokin analizlerine kadar saklanmak üzere yerleştirildi. ELISA yöntemi ile sitokin analizlerinin temel prensibi aşağıdaki şekilde gösterilmiştir.



Şekil 2.1. ELISA yöntemi ile sitokin ölçümü (1) Plaktaki kuyucuklar uygun bir antikorla kaplanır. (2) Standart ve örnek içindeki ilgili antijen (sitokin) kaplı antikora bağlanır. (3) Biotin konjugatlı ikincil antikor eklenir antijene bağlanır. (4) Streptavidin-HRP eklenir ve biotin konjugatlı ikincil antikora bağlanır. (5) Standart ve örnek içindeki antijen miktarına göre renklenme (mavi) gözlenir. Durdurma çözeltisi olarak asit eklenir ve reaksiyon sona erdirilir, mavi renk sarıya döner. Sarı rengin şiddeti spektrofotometrik olarak 450 nm'de okunur.

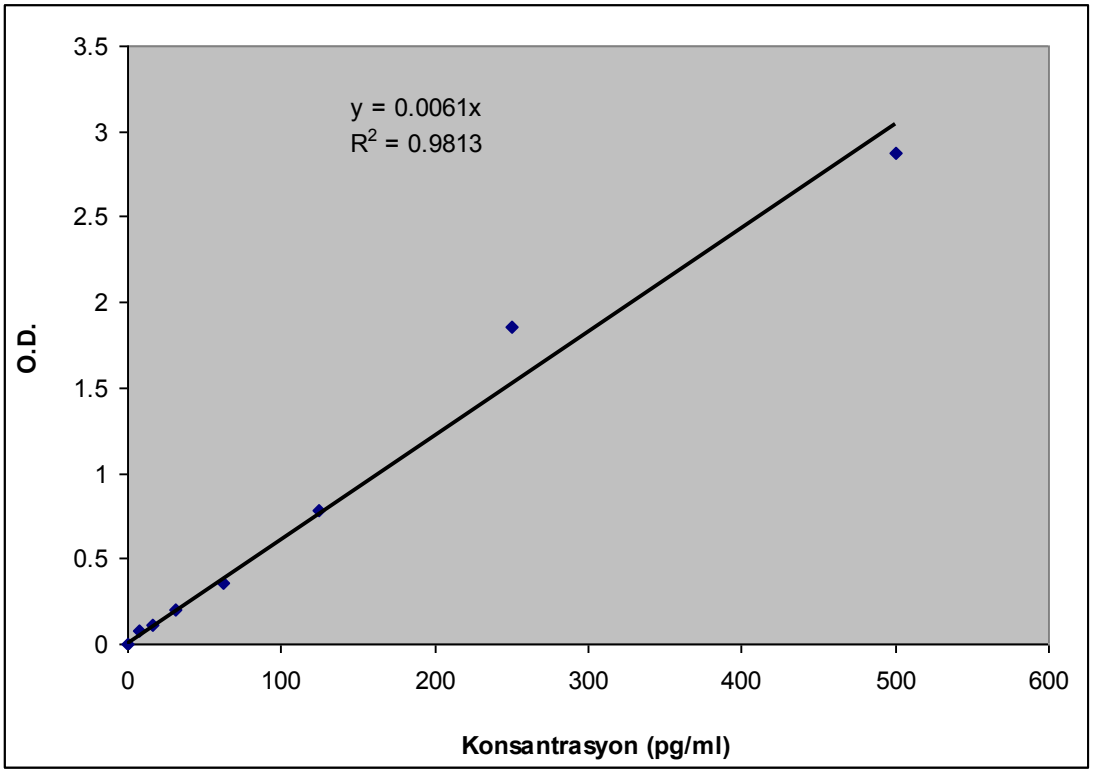


Şekil 2.2. Standart ve örneklerin ELISA plağına uygulanışı

2.1.8.1. IL-1α ölçümü

Bender MedSystems Mouse IL-1α Platinum ELISA kiti (Katalog no: BMS611) kullanılarak ölçüm yapıldı. Kit protokolüne göre; IL-1α için spesifik bir antikorla kaplanmış plaklar ilk olarak 400 µl yıkama çözeltisi ile iki kez otomatik ELISA yıkayıcısında yıkandı. Yıkama sırasında plaklar yıkama çözeltisi ile 10-15 saniye bekletildikten sonra aspire edildi. Mikrokuyucukların alt yüzeylerinin aspirasyon sırasında zedelenmemesine dikkat edildi (Yıkamadan hemen sonra plakların kurumasına izin vermeden kullanılmalıdır veya en fazla 15 dakika bekletilmelidir). Yıkamanın hemen ardından 50 µl 7 farklı konsantrasyonda (500 pg/ml - 250 pg/ml - 125 pg/ml - 62,5 pg/ml - 31,3 pg/ml - 15,6 pg/ml – 7,8 pg/ml) hazırlanmış standartlar ve örnekler eklendi. Dublicate çalışıldı. 50 µl örnek çözeltisi standart ve örnek bulunan kuyucuklara eklendi. Biotin konjugatı hazırlandı ve 50 µl eklendi. Yapışkanlı film ile kaplandı ve oda sıcaklığında (18-25°C'de) 2 saat inkübe edildi. 2 saatin sonuna doğru streptavidin-HRP hazırlandı. İnkubasyon süresi bittikten sonra yapışkanlı film kaldırıldı

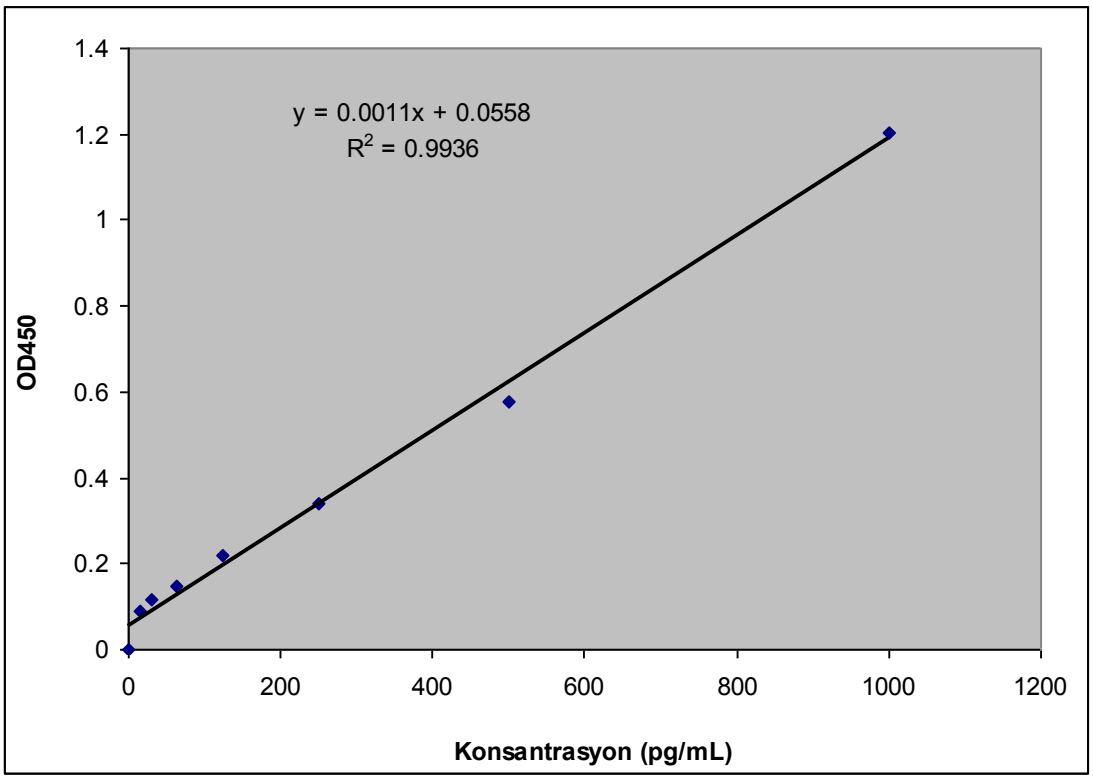
ve kuyucuklar boşaltıldı. Kuyucuklar 3 kez otomatik ELISA yıkayıcısında yıkandı. Ardından 100 µl streptavidin-HRP bütün kuyucuklara eklendi. Yapışkanlı film ile kaplandı ve oda sıcaklığında (18-25°C'de) 1 saat inkübe edildi. 1 saatin sonunuda yapışkanlı film kaldırıldı ve kuyucuklar boşaltıldı. Kuyucuklar 3 kez otomatik ELISA yıkayıcısı ile yıkandı. Bütün kuyucuklara 100 µl TMB substrat çözeltisi eklendi. 10 dakika oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübe edildikten sonra renk değişimi gözlendi. 100 µl stop solüsyonu eklendi, rengin maviden sarıya değişimi gözlendi ve ELISA okuyucu'da 450 nm'de standartların ve örneklerin optik dansiteleri ölçüldü. Standart eğri grafiği çizildi, doğru denklemi bulundu ve bu denklemden hareketle örneklerin IL-1α miktarları hesaplandı.



Şekil 2.3. IL-1α miktarının ölçümünde kullanılan standart doğru denklemi.

2.1.8.2. IL-2 ölçümü

Bender MedSystems Mouse IL-2 Platinum ELISA kiti (Katalog no: BMS601) kullanılarak ölçüm yapıldı. Kit protokolüne göre; IL-2 için spesifik bir antikorla kaplanmış plaklar ilk olarak 400 µl yıkama çözeltisi ile iki kez otomatik ELISA yıkayıcısında yıkandı. Yıkama sırasında plaklar yıkama çözeltisi ile 10-15 saniye bekletildikten sonra aspire edildi. Mikrokuyucukların alt yüzeylerinin aspirasyon sırasında zedelenmemesine dikkat edildi (Yıkamadan hemen sonra plakların kurumasına izin vermeden kullanılmalıdır veya en fazla 15 dakika bekletilmelidir). Yıkamanın hemen ardından 50 µl 7 farklı konsantrasyonda (1000 pg/ml - 500 pg/ml - 250 pg/ml - 125 pg/ml - 62,5 pg/ml - 31,3 pg/ml - 15,6 pg/ml) hazırlanmış standartlar ve örnekler eklendi. Dublicate çalışıldı. 50 µl örnek çözeltisi standart ve örnek bulunan kuyucuklara eklendi. Biotin konjugatı hazırlandı ve 50 µl eklendi. Yapışkanlı film ile kaplandı ve oda sıcaklığında (18-25°C'de) 2 saat inkübe edildi. 2 saatin sonuna doğru streptavidin-HRP hazırlandı. İnkubasyon süresi bittikten sonra yapışkanlı film kaldırıldı ve kuyucuklar boşaltıldı. Kuyucuklar 3 kez otomatik ELISA yıkayıcısında yıkandı. Ardından 100 µl streptavidin-HRP bütün kuyucuklara eklendi. Yapışkanlı film ile kaplandı ve oda sıcaklığında (18-25°C'de) 1 saat inkübe edildi. 1 saatin sonunuda yapışkanlı film kaldırıldı ve kuyucuklar boşaltıldı. Kuyucuklar 3 kez otomatik ELISA yıkayıcısı ile yıkandı. Bütün kuyucuklara 100 µl TMB substrat çözeltisi eklendi. 10 dakika oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübe edildikten sonra renk değişimi gözlendi. 100 µl stop solüsyonu eklendi, rengin maviden sarıya değişimi gözlendi ve ELISA okuyucu'da 450 nm'de standartların ve örneklerin optik dansiteleri ölçüldü. Standart eğri grafiği çizildi, doğru denklemi bulundu ve bu denklemden hareketle örneklerin IL-2 miktarları hesaplandı.

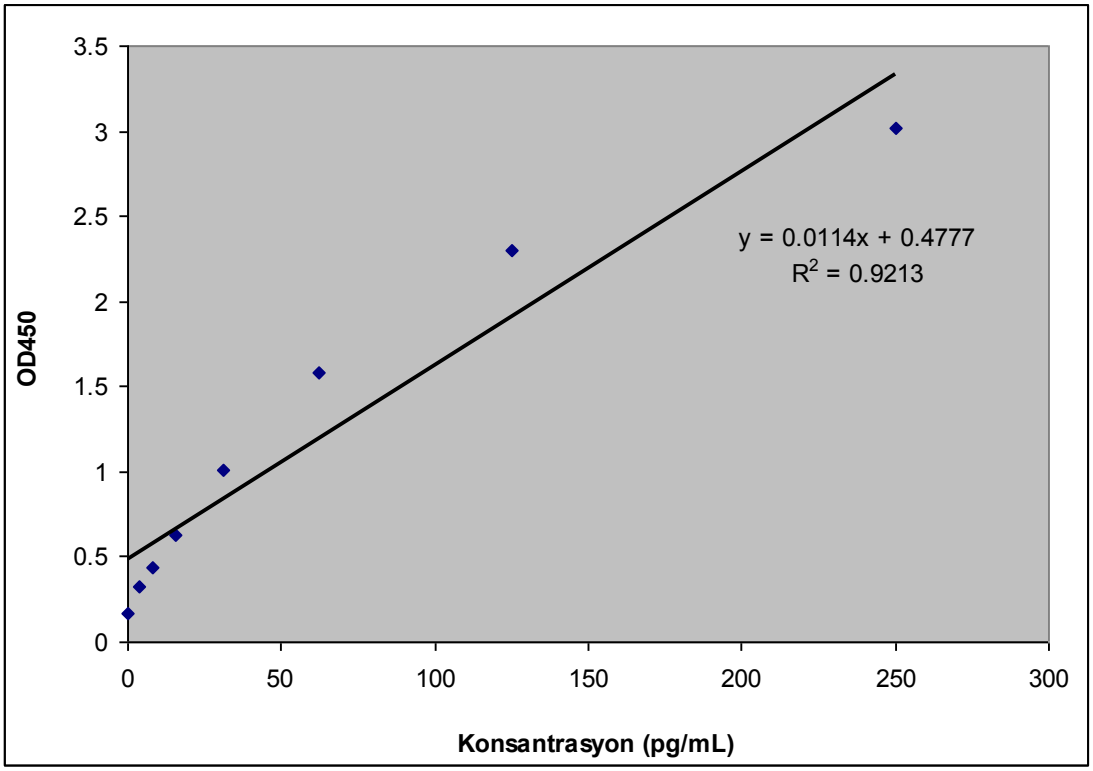


Şekil 2.4. IL-2 miktarının ölçümünde kullanılan standart doğru denklemi.

2.1.8.3. IL-4 ölçümü

Bender MedSystems Mouse IL-4 Platinum ELISA kiti (Katalog no: BMS613) kullanılarak ölçüm yapıldı. Kit protokolüne göre; IL-4 için spesifik bir antikorla kaplanmış plaklar ilk olarak 400 µl yıkama çözeltisi ile iki kez otomatik ELISA yıkayıcısında yıkandı. Yıkama sırasında plaklar yıkama çözeltisi ile 10-15 saniye bekletildikten sonra aspire edildi. Mikrokuyucukların alt yüzeylerinin aspirasyon sırasında zedelenmemesine dikkat edildi (Yıkamadan hemen sonra plakların kurumasına izin vermeden kullanılmalıdır veya en fazla 15 dakika bekletilmelidir). Yıkamanın hemen ardından 50 µl 7 farklı konsantrasyonda (250 pg/ml - 125 pg/ml - 62,5 pg/ml - 31,3 pg/ml - 15,6 pg/ml – 7,8 pg/ml – 3.9 pg/ml) hazırlanmış standartlar ve

örnekler eklendi. Dublicate çalışıldı. 50 µl örnek çözeltisi standart ve örnek bulunan kuyucuklara eklendi. Biotin konjugatı hazırlandı ve 50 µl eklendi. Yapışkanlı film ile kaplandı ve oda sıcaklığında (18-25°C'de) 2 saat inkübe edildi. 2 saatin sonuna doğru streptavidin-HRP hazırlandı. İnkubasyon süresi bittikten sonra yapışkanlı film kaldırıldı ve kuyucuklar boşaltıldı. Kuyucuklar 3 kez otomatik ELISA yıkayıcısında yıkandı. Ardından 100 µl streptavidin-HRP bütün kuyucuklara eklendi. Yapışkanlı film ile kaplandı ve oda sıcaklığında (18-25°C'de) 1 saat inkübe edildi. 1 saatin sonunuda yapışkanlı film kaldırıldı ve kuyucuklar boşaltıldı. Kuyucuklar 3 kez otomatik ELISA yıkayıcısı ile yıkandı. Bütün kuyucuklara 100 µl TMB substrat çözeltisi eklendi. 10 dakika oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübe edildikten sonra renk değişimi gözlendi. 100 µl stop solüsyonu eklendi, rengin maviden sarıya değişimi gözlendi ve ELISA okuyucu'da 450 nm'de standartların ve örneklerin optik dansiteleri ölçüldü. Standart eğri grafiği çizildi, doğru denklemi bulundu ve bu denklemden hareketle örneklerin IL-4 miktarları hesaplandı.

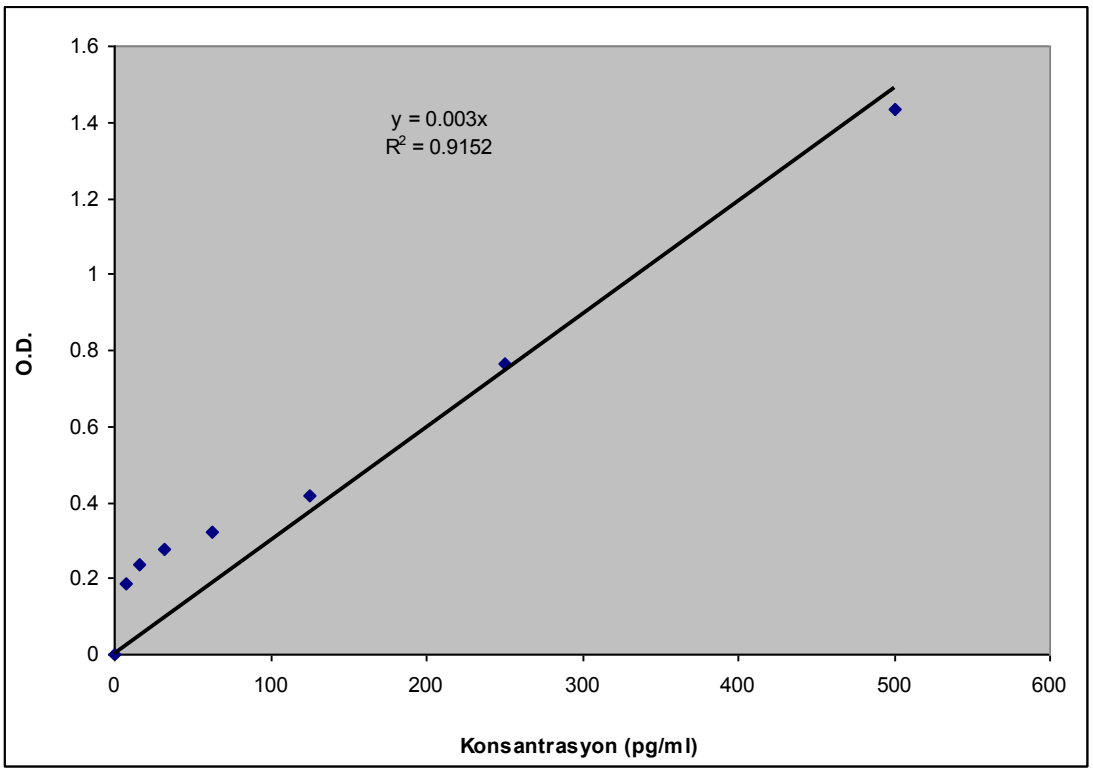


Şekil 2.5. IL-4 miktarının ölçümünde kullanılan standart doğru denklemi.

2.1.8.4. IL-5 ölçümü

Bender MedSystems Mouse IL-5 Platinum ELISA kiti (Katalog no: BMS610) kullanılarak ölçüm yapıldı. Kit protokolüne göre; IL-5 için spesifik bir antikorla kaplanmış plaklar ilk olarak 400 µl yıkama çözeltisi ile iki kez otomatik ELISA yıkayıcısında yıkandı. Yıkama sırasında plaklar yıkama çözeltisi ile 10-15 saniye bekletildikten sonra aspire edildi. Mikrokuyucukların alt yüzeylerinin aspirasyon sırasında zedelenmemesine dikkat edildi (Yıkamadan hemen sonra plakların kurumasına izin vermeden kullanılmalıdır veya en fazla 15 dakika bekletilmelidir). Yıkamanın hemen ardından 50 µl 7 farklı konsantrasyonda (500 pg/ml - 250 pg/ml - 125 pg/ml - 62,5 pg/ml - 31,3 pg/ml - 15,6 pg/ml – 7,8 pg/ml) hazırlanmış standartlar ve örnekler eklendi. Dublicate çalışıldı. 50 µl örnek çözeltisi standart ve

örnek bulunan kuyucuklara eklendi. Biotin konjugatı hazırlandı ve 50 µl eklendi. Yapışkanlı film ile kaplandı ve oda sıcaklığında (18-25°C'de) 2 saat inkübe edildi. 2 saatin sonuna doğru streptavidin-HRP hazırlandı. İnkubasyon süresi bittikten sonra yapışkanlı film kaldırıldı ve kuyucuklar boşaltıldı. Kuyucuklar 3 kez otomatik ELISA yıkayıcısında yıkandı. Ardından 100 µl streptavidin-HRP bütün kuyucuklara eklendi. Yapışkanlı film ile kaplandı ve oda sıcaklığında (18-25°C'de) 1 saat inkübe edildi. 1 saatin sonunuda yapışkanlı film kaldırıldı ve kuyucuklar boşaltıldı. Kuyucuklar 3 kez otomatik ELISA yıkayıcısı ile yıkandı. Bütün kuyucuklara 100 µl TMB substrat çözeltisi eklendi. 10 dakika oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübe edildikten sonra renk değişimi gözlendi. 100 µl stop solüsyonu eklendi, rengin maviden sarıya değişimi gözlendi ve ELISA okuyucu'da 450 nm'de standartların ve örneklerin optik dansiteleri ölçüldü. Standart eğri grafiği çizildi, doğru denklemi bulundu ve bu denklemden hareketle örneklerin IL-5 miktarları hesaplandı.

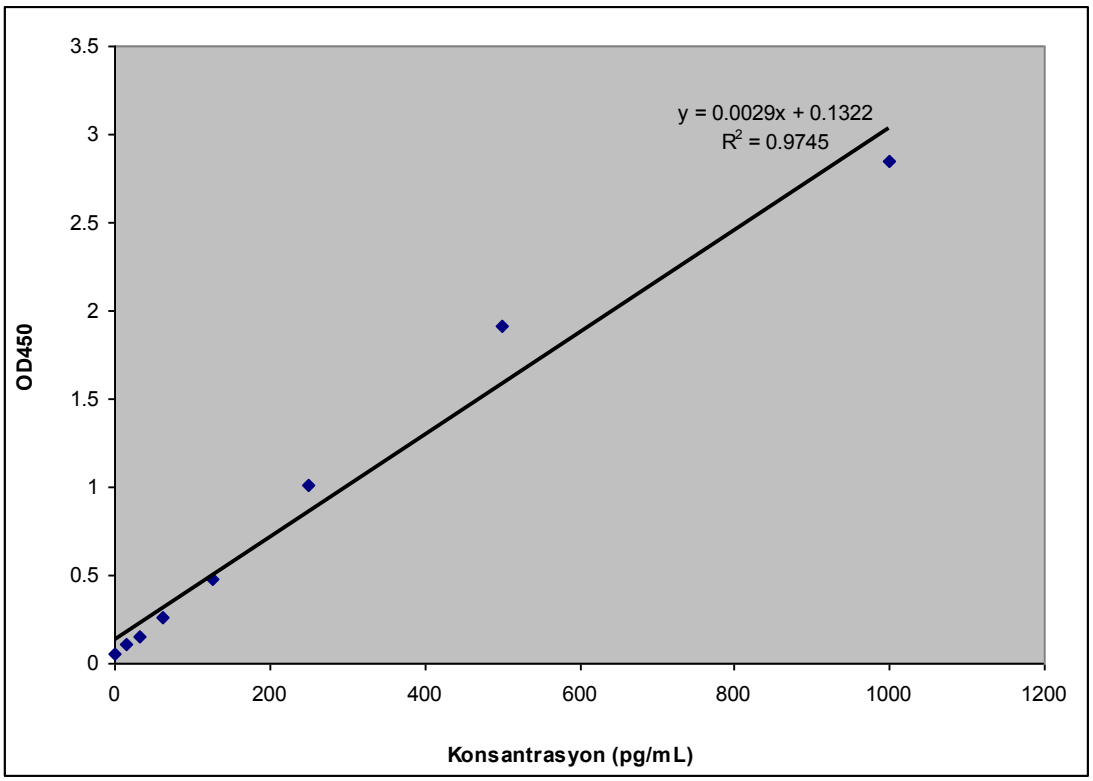


Şekil 2.6. IL-5 miktarının ölçümünde kullanılan standart doğru denklemi.

2.1.8.5. IFN-γ ölçümü

Bender MedSystems Mouse IFN-γ Platinum ELISA kiti (Katalog no: BMS606) kullanılarak ölçüm yapıldı. Kit protokolüne göre; IFN-γ için spesifik bir antikorla kaplanmış plaklar ilk olarak 400 µl yıkama çözeltisi ile iki kez otomatik ELISA yıkayıcısında yıkandı. Yıkama sırasında plaklar yıkama çözeltisi ile 10-15 saniye bekletildikten sonra aspire edildi. Mikrokuyucukların alt yüzeylerinin aspirasyon sırasında zedelenmemesine dikkat edildi (Yıkamadan hemen sonra plakların kurumasına izin vermeden kullanılmalıdır veya en fazla 15 dakika bekletilmelidir). Yıkamanın hemen ardından 50 µl 7 farklı konsantrasyonda (1000 pg/ml - 500 pg/ml - 250 pg/ml - 125 pg/ml - 62,5 pg/ml - 31,3 pg/ml - 15,6 pg/ml) hazırlanmış standartlar ve örnekler eklendi. Dublicate çalışıldı. 50 µl örnek çözeltisi standart ve

örnek bulunan kuyucuklara eklendi. Biotin konjugatı hazırlandı ve 50 µl eklendi. Yapışkanlı film ile kaplandı ve oda sıcaklığında (18-25°C'de) 2 saat inkübe edildi. 2 saatin sonuna doğru streptavidin-HRP hazırlandı. İnkubasyon süresi bittikten sonra yapışkanlı film kaldırıldı ve kuyucuklar boşaltıldı. Kuyucuklar 3 kez otomatik ELISA yıkayıcısında yıkandı. Ardından 100 µl streptavidin-HRP bütün kuyucuklara eklendi. Yapışkanlı film ile kaplandı ve oda sıcaklığında (18-25°C'de) 1 saat inkübe edildi. 1 saatin sonunuda yapışkanlı film kaldırıldı ve kuyucuklar boşaltıldı. Kuyucuklar 3 kez otomatik ELISA yıkayıcısı ile yıkandı. Bütün kuyucuklara 100 µl TMB substrat çözeltisi eklendi. 10 dakika oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübe edildikten sonra renk değişimi gözlendi. 100 µl stop solüsyonu eklendi, rengin maviden sarıya değişimi gözlendi ve ELISA okuyucu'da 450 nm'de standartların ve örneklerin optik dansiteleri ölçüldü. Standart eğri grafiği çizildi, doğru denklemi bulundu ve bu denklemden hareketle örneklerin IFN-γ miktarları hesaplandı.

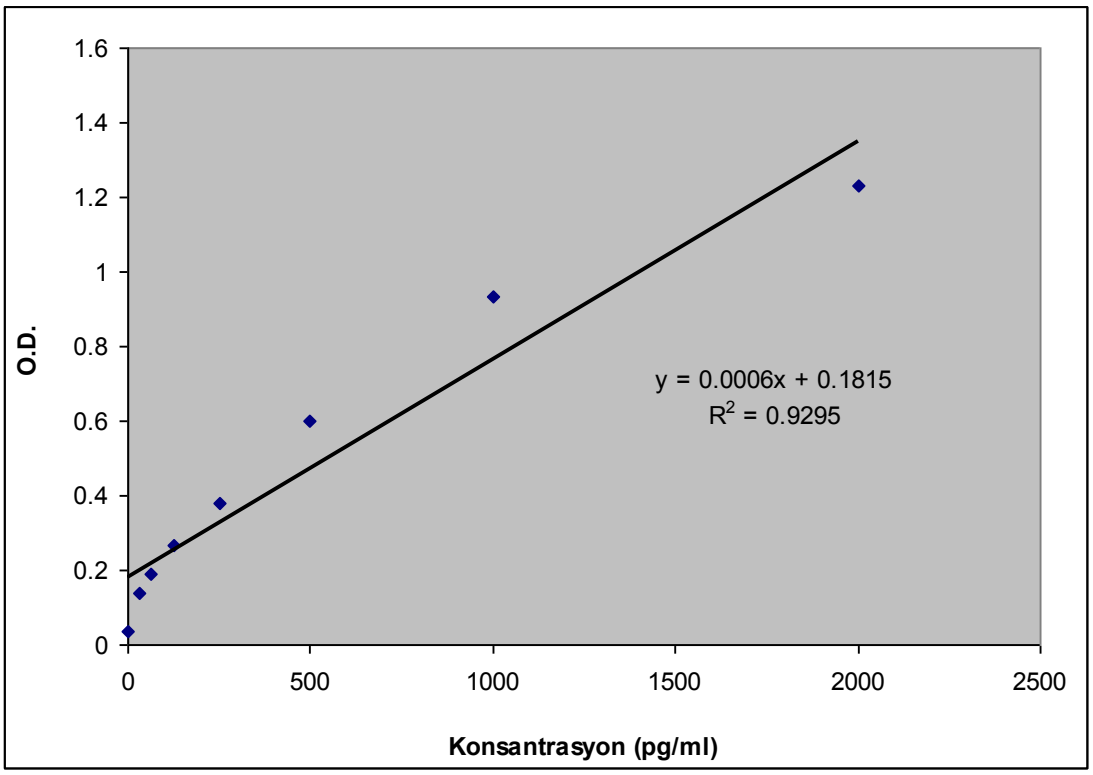


Şekil 2.7. IFN-γ miktarının ölçümünde kullanılan standart doğru denklemi.

2.1.8.6. TNF-α ölçümü

Bender MedSystems Mouse TNF-α Platinum ELISA kiti (Katalog no: BMS607/3) kullanılarak ölçüm yapıldı. Kit protokolüne göre; TNF-α için spesifik bir antikorla kaplanmış plaklar ilk olarak 400 µl yıkama çözeltisi ile iki kez otomatik ELISA yıkayıcısında yıkandı. Yıkama sırasında plaklar yıkama çözeltisi ile 10-15 saniye bekletildikten sonra aspire edildi. Mikrokuyucukların alt yüzeylerinin aspirasyon sırasında zedelenmemesine dikkat edildi (Yıkamadan hemen sonra plakların kurumasına izin vermeden kullanılmalıdır veya en fazla 15 dakika bekletilmelidir). Yıkamanın hemen ardından 50 µl 7 farklı konsantrasyonda (2000 pg/ml - 1000 pg/ml - 500 pg/ml - 250 pg/ml - 125 pg/ml - 62,5 pg/ml - 31,3 pg/ml) hazırlanmış standartlar ve örnekler eklendi. Dublicate çalışıldı. 50 µl örnek çözeltisi standart ve

örnek bulunan kuyucuklara eklendi. Biotin konjugatı hazırlandı ve 50 µl eklendi. Yapışkanlı film ile kaplandı ve oda sıcaklığında (18-25°C'de) 2 saat inkübe edildi. 2 saatin sonuna doğru streptavidin-HRP hazırlandı. İnkubasyon süresi bittikten sonra yapışkanlı film kaldırıldı ve kuyucuklar boşaltıldı. Kuyucuklar 3 kez otomatik ELISA yıkayıcısında yıkandı. Ardından 100 µl streptavidin-HRP bütün kuyucuklara eklendi. Yapışkanlı film ile kaplandı ve oda sıcaklığında (18-25°C'de) 1 saat inkübe edildi. 1 saatin sonunuda yapışkanlı film kaldırıldı ve kuyucuklar boşaltıldı. Kuyucuklar 3 kez otomatik ELISA yıkayıcısı ile yıkandı. Bütün kuyucuklara 100 µl TMB substrat çözeltisi eklendi. 10 dakika oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübe edildikten sonra renk değişimi gözlendi. 100 µl stop solüsyonu eklendi, rengin maviden sarıya değişimi gözlendi ve ELISA okuyucu'da 450 nm'de standartların ve örneklerin optik dansiteleri ölçüldü. Standart eğri grafiği çizildi, doğru denklemi bulundu ve bu denklemden hareketle örneklerin TNF-α miktarları hesaplandı.



Şekil 2.8. TNF-α miktarının ölçümünde kullanılan standart doğru denklemi.

2.1.9. İstatistiksel analizler

Lenf düğümü ağırlıklarının, optik dansite verilerinin ve sitokin düzeylerinin ortalama ve standart hata değerleri hesaplandı. Gruplar arası farklılıklar Mann-Whitney U test analizi ile istatistiksel olarak değerlendirildi. İstatistiksel olarak anlamlılık bulunduğunda, sadece çözücü uygulanan kontrol grubu ile test kimyasalının uygulandığı her bir grubun kıyaslanması **Dunnet's testi** ile yapıldı.

Bu testler, "SPSS for Windows-Release 10.0" programı kullanılarak yapılmıştır.

3. BULGULAR

3.1. DNCB kullanılarak yapılan deneyin sonuçları

3.1.1. DNCB maruziyeti sonucu hesaplanan lenf düğümü ağırlıkları, lenfosit sayıları ve maruziyet öncesi ve sonrası %kulak kalınlıkları değişimi

AOO içerisinde farklı konsantrasyonlarda çözünmüş halde farelerin kulak arkalarına uygulanan DNCB ile elde edilen lenf düğümü ağırlıkları, hücre sayıları ve % kulak kalınlığı değişimi Çizelge 3.1' de görüldüğü gibidir. Çözücü olarak uygulanan AOO ile karşılaştırıldığında DNCB, doza bağlı olarak farelerin lenf düğümü ağırlıklarında ve lenfosit sayılarında belirgin bir artışa sebep olurken; kulak kalınlıklarında ilk ölçüme göre %25' in altında bir artış oluşturmuştur. Negatif kontrol olarak uygulanan PABA ile farelerin belirtilen parametrelerinde anlamlı artışlar olmadığı gözlenmiştir.

Çizelge 3.1. AOO ile çözünmüş farklı konsantrasyonlardaki DNCB ve PABA maruziyeti sonrası farelerin lenf düğümü ağırlıkları, hücre sayıları ve % kulak kalınlıkları değişimi

Kimyasal	**Çözücü**	**Konsantrasyon (a/h%)**	**Lenf düğümü ağırlığı (g)**	**Lenfosit sayısı (10^6/mL)**	**% Kulak kalınlığı değişimi**
DNCB	AOO	-------	0.022 ± 0.002	6.05 ± 2.96	0
		0.025	0.025 ± 0.002	9.62 ± 2.47	2.7
		0.05	0.029 ± 0.003	11.35 ± 4.31	4
		0.1	0.045± 0.009	16.32 ± 9.50	13
		0.25	0.060 ± 0.020	17.54 ± 2.94	16.9
PABA	AOO	-------	0.022 ± 0.002	6.05 ± 2.96	0
		1	0.023 ± 0.013	6.20 ± 2.25	0
		2.5	0.020 ± 0.010	6.14 ± 1.12	0
		5	0.024 ± 0.007	6.22 ± 2.22	0
		10	0.026 ± 0.007	6.27 ± 2.22	10

3.1.2. DNCB maruziyeti sonucu hesaplanan optik dansite (OD) ve stimülasyon indeksi (SI) değerleri

AOO içinde çözünmüş DNCB uygulanan her bir gruba ait ortalama OD_{450} değerleri ile OD_{450} değerlerinin sadece çözücü (AOO) uygulanmış kontrol grubuna ait ortalama OD_{450} değerine oranı ile hesaplanan Sİ değerleri Çizelge 3.2' de gösterilmiştir. % 0.05' lik DNCB konsantrasyonunda SI değeri 3.21 olarak tespit edilmiştir. Artan konsantrasyona bağlı olarak PABA uygulanan farelerden hesaplanan OD ve SI değerlerinde anlamlı bir artış olmazken, sadece AOO uygulanan farelere göre DNCB uygulanan farelerin OD ve SI değerlerinde anlamlı bir artış olduğu gözlenmiştir.

Çizelge 3.2. AOO ile çözünmüş farklı konsantrasyonlardaki DNCB ve PABA maruziyeti sonrası hesaplanan Optik Dansite ve Stimülasyon İndeksi değerleri

Kimyasal	**Çözücü**	**Konsantrasyon (a/h%)**	**OD_{450}**	**SI**
DNCB	AOO	-------	0.07	1
		0.025	0.18	2.65
		0.05	0.22	3.21
		0.1	0.32	4.49
		0.25	0.34	4.77
PABA	AOO	-------	0.07	1
		1	0.11	1.62
		2.5	0.12	1.66
		5	0.12	1.81
		10	0.17	2.46

3.1.3. DNCB uygulanan farelerin kulak arkası lenf düğümlerinden elde edilen lenfosit hücre kültürlerindeki sitokin düzeyleri

AOO içerisinde çözünmüş DNCB ve PABA' nın farklı konsantrasyonlarının farelere lokal olarak uygulanması sonucu farelerin çıkarılan lenf düğümlerinden salınan sitokinlerden birkaçı ölçülmüştür. Bunlardan IL-2, IFN-γ, IL-4, IL-5, TNF-α ve IL-1 SI değerleri Çizelge 3.3' te gösterildiği gibidir. Çözücü olarak kullanılan AOO' e göre DNCB' in özellikle yüksek konsantrasyonlarında IL-2, IFN-γ, IL-4 ve IL-5 düzeylerinde anlamlı artışa neden olduğu gözlenmiştir.

Çizelge 3.3. AOO ile çözünmüş farklı konsantrasyonlardaki DNCB ve PABA maruziyeti sonrası ölçülen sitokin düzeyleri

Kimyasal	Konsantrasyon (a/h%)	IL-2 SI	IFN-γ SI	IL-4 SI	IL-5 SI	TNF-α SI	IL-1 SI
DNCB	-------	1	1	1	1	1	1
	0.025	1.6	1.98	2.44	1.19	2.54	1.21
	0.05	3.128	4.53	3.31	1.47	1.83	1.39
	0.1	4.96	5.22	3.90	1.62	3.84	1.41
	0.25	5.23	6.09	7.61	2.99	4.60	1.46
PABA	-------	1	1	1	1	1	1
	1	1.09	1.08	1.4	1.2	1.08	1.47
	2.5	1.53	1.20	1.45	1.71	1.11	1.56
	5	1.42	1.29	2.01	1.72	1.36	1.61
	10	1.74	1.42	2.22	2.02	1.61	1.25

3.2. Öjenol kullanılarak yapılan deneyin sonuçları

3.2.1. Öjenol maruziyeti sonucu hesaplanan lenf düğümü ağırlıkları, lenfosit sayıları ve maruziyet öncesi ve sonrası % kulak kalınlıkları değişimi

AOO içerisinde farklı konsantrasyonlarda çözünmüş halde farelerin kulak arkalarına uygulanan alerjik bir madde olduğu bilinen öjenol ile elde edilen lenf düğümü ağırlıkları, hücre sayıları ve % kulak kalınlığı değişimi Çizelge 3.4' te görüldüğü gibidir. Çözücü olarak uygulanan AOO ile karşılaştırıldığında öjenol, doza bağlı olarak farelerin lenf düğümü ağırlıklarında ve lenfosit sayılarında belirgin bir artışa sebep olurken; kulak kalınlıklarındaki artışın %25' in altında olduğu gözlenmiştir. Negatif kontrol olarak uygulanan PABA ile farelerin belirtilen parametrelerinde anlamlı artışlar olmadığı gözlenmiştir.

Çizelge 3.4. AOO ile çözünmüş farklı konsantrasyonlardaki öjenol ve PABA maruziyeti sonrası farelerin lenf düğümü ağırlıkları, hücre sayıları ve % kulak kalınlıkları değişimi

Kimyasal	**Çözücü**	**Konsantrasyon (a/h%)**	**Lenf düğümü ağırlığı (g)**	**Lenfosit sayısı (10^6/mL)**	**% Kulak kalınlığı değişimi**
Öjenol	AOO	-------	0.022 ± 0.002	6.05 ± 2.96	0
		2.5	0.023 ± 0.002	6.52 ± 4.21	7.5
		10	0.036 ± 0.002	8.22 ± 4.23	20
		20	0.038 ± 0.005	9.62 ± 2.47	20
		50	0.046 ± 0.017	12.25± 3.21	17
PABA	AOO	-------	0.022 ± 0.002	6.05 ± 2.96	0
		1	0.023 ± 0.013	6.20 ± 2.25	0
		2.5	0.020 ± 0.010	6.14 ± 1.12	0
		5	0.024 ± 0.007	6.22 ± 2.22	0
		10	0.026 ± 0.007	6.27 ± 2.22	10

3.2.2. Öjenol maruziyeti sonucu hesaplanan optik dansite (OD) ve stimülasyon indeksi (SI) değerleri

AOO içinde çözünmüş öjenol uygulanan her bir gruba ait ortalama OD_{450} değerleri ile OD_{450} değerlerinin sadece çözücü (AOO) uygulanmış kontrol grubuna ait ortalama OD_{450} değerine oranı ile hesaplanan SI değerleri Çizelge 3.5' te gösterilmiştir. % 20' lik öjenol konsantrasyonunda SI değeri 3.39 olarak tespit edilmiştir. Artan konsantrasyona bağlı olarak PABA uygulanan farelerden hesaplanan OD ve SI değerlerinde anlamlı bir artış oluşmazken, sadece AOO uygulanan farelere göre öjenol uygulanan farelerin OD ve SI değerlerinde önemli bir artış olduğu gözlenmiştir.

Çizelge 3.5. AOO ile çözünmüş farklı konsantrasyonlardaki öjenol ve PABA maruziyeti sonrası hesaplanan Optik Dansite ve Stimülasyon İndeksi değerleri

Kimyasal	**Çözücü**	**Konsantrasyon (a/h%)**	**OD_{450}**	**SI**
Öjenol	AOO	-------	0.07	1
		2.5	0.18	2.55
		10	0.19	2.75
		20	0.24	3.39
		50	0.25	3.43
PABA	AOO	-------	0.07	1
		1	0.11	1.62
		2.5	0.12	1.66
		5	0.12	1.81
		10	0.17	2.46

3.2.3. Öjenol uygulanan farelerin kulak arkası lenf düğümlerinden elde edilen lenfosit hücre kültürlerindeki sitokin düzeyleri

AOO içerisinde çözünmüş öjenol ve PABA' nın farklı konsantrasyonlarının farelere lokal olarak uygulanması sonucu farelerin çıkarılan lenf düğümlerinden salınan sitokinlerden birkaçı ölçülmüştür. Bunlardan IL-2, IFN-γ, IL-4, IL-5, TNF-α ve IL-1 SI değerleri Çizelge 3.6' da gösterildiği gibidir. Çözücü olarak kullanılan AOO' e göre öjenolün özellikle yüksek konsantrasyonlarda IL-2, IFN-γ, IL-4 ve IL-5 düzeylerinde anlamlı artışa neden olduğu gözlenmiştir.

Çizelge 3.6. AOO ile çözünmüş farklı konsantrasyonlardaki öjenol ve PABA maruziyeti sonrası ölçülen sitokin düzeyleri

Kimyasal	**Konsantrasyon (a/h%)**	**IL-2 SI**	**IFN-γ SI**	**IL-4 SI**	**IL-5 SI**	**TNF-α SI**	**IL-1 SI**
Öjenol	-------	1	1	1	1	1	1
	2.5	1.6	2.14	2.30	2.06	4.19	1.04
	10	1.75	2.24	7.32	2.25	2.3	1.20
	20	1.78	3.12	7.26	3.53	4.43	1.16
	50	2.32	3.24	10.10	4.51	1.56	1.23
PABA	-------	1	1	1	1	1	1
	1	1.09	1.08	1.4	1.2	1.08	1.47
	2.5	1.53	1.20	1.45	1.71	1.11	1.56
	5	1.42	1.29	2.01	1.72	1.36	1.61
	10	1.74	1.42	2.22	2.02	1.61	1.25

3.3. İzoöjenol kullanılarak yapılan deneyin sonuçları

3.3.1. İzoöjenol maruziyeti sonucu hesaplanan lenf düğümü ağırlıkları, lenfosit sayıları ve maruziyet öncesi ve sonrası % kulak kalınlıkları değişimi

AOO içerisinde farklı konsantrasyonlarda çözünmüş halde farelerin kulak arkalarına uygulanan alerjik bir madde olduğu bilinen izoöjenol ile elde edilen lenf düğümü ağırlıkları, hücre sayıları ve % kulak kalınlığı değişimi Çizelge 3.7' de görüldüğü gibidir. Çözücü olarak uygulanan AOO ile karşılaştırıldığında izoöjenol, doza bağlı olarak farelerin lenf düğümü ağırlıklarında ve lenfosit sayılarında belirgin bir artışa sebep olduğu gözlenmiştir. Kulak kalınlıklarında ise yalnızca %10 konsantrasyonda %26' lık bir artış gözlenmiştir. Negatif kontrol olarak uygulanan PABA ile farelerin belirtilen parametrelerinde anlamlı artışlar olmadığı gözlenmiştir.

Çizelge 3.7. AOO ile çözünmüş farklı konsantrasyonlardaki izoöjenol ve PABA maruziyeti sonrası farelerin lenf düğümü ağırlıkları, hücre sayıları ve % kulak kalınlıkları değişimi

Kimyasal	Çözücü	Konsantrasyon (a/h%)	Lenf düğümü ağırlığı (g)	Lenfosit sayısı (10^6/mL)	% Kulak kalınlığı değişimi
İzoöjenol	AOO	-----	0.022 ± 0.002	6.05 ± 2.96	0
		0.5	0.023 ± 0.010	6.88 ± 1.13	0
		1	0.033 ± 0.009	9.28 ± 0.45	7
		5	0.038 ± 0.007	13.28 ± 0.67	10.7
		10	0.039 ± 0.005	14.72 ±7.24	26
PABA	AOO	-------	0.022 ± 0.002	6.05 ± 2.96	0
		1	0.023 ± 0.013	6.20 ± 2.25	0
		2.5	0.020 ± 0.010	6.14 ± 1.12	0
		5	0.024 ± 0.007	6.22 ± 2.22	0
		10	0.026 ± 0.007	6.27 ± 2.22	10

3.3.2. İzoöjenol maruziyeti sonucu hesaplanan optik dansite (OD) ve stimülasyon indeksi (SI) değerleri

AOO içinde çözünmüş öjenol uygulanan her bir gruba ait ortalama OD_{450} değerleri ile OD_{450} değerlerinin sadece çözücü (AOO) uygulanmış kontrol grubuna ait ortalama OD_{450} değerine oranı ile hesaplanan SI değerleri Çizelge 3.8' de gösterilmiştir. % 5' lik izoöjenol konsantrasyonunda SI değeri 3.84 olarak tespit edilmiştir. Artan konsantrasyona bağlı olarak PABA uygulanan farelerden hesaplanan OD ve SI değerlerinde anlamlı bir artış oluşmazken, sadece AOO uygulanan farelere göre izöjenol uygulanan farelerin OD ve SI değerlerinde önemli bir artış olduğu gözlenmiştir.

Çizelge 3.8. AOO ile çözünmüş farklı konsantrasyonlardaki öjenol ve PABA maruziyeti sonrası hesaplanan Optik Dansite ve Stimülasyon İndeksi değerleri

Kimyasal	**Çözücü**	**Konsantrasyon (a/h%)**	**OD_{450}**	**SI**
İzoöjenol	AOO	-----	0.07	1
		0.5	0.16	2.31
		1	0.22	2.93
		5	0.27	3.84
		10	0.36	5.14
PABA	AOO	-------	0.07	1
		1	0.11	1.62
		2.5	0.12	1.66
		5	0.12	1.81
		10	0.17	2.46

3.3.3. İzoöjenol uygulanan farelerin kulak arkası lenf düğümlerinden elde edilen lenfosit hücre kültürlerindeki sitokin düzeyleri

AOO içerisinde çözünmüş izöjenol ve PABA' nın farklı konsantrasyonlarının farelere lokal olarak uygulanması sonucu farelerin çıkarılan lenf düğümlerinden salınan sitokinlerden birkaçı ölçülmüştür. Bunlardan IL-2, IFN-γ, IL-4, IL-5, TNF-α ve IL-1 SI değerleri Çizelge 3.9' da gösterildiği gibidir. Çözücü olarak kullanılan AOO' e göre izöjenolün özellikle yüksek konsantrasyonlarda IL-2, IFN-γ, IL-4 ve IL-5 düzeylerinde anlamlı artışa neden olduğu gözlenmiştir.

Çizelge 3.9. AOO ile çözünmüş farklı konsantrasyonlardaki izoöjenol ve PABA maruziyeti sonrası ölçülen sitokin düzeyleri

Kimyasal	**Konsantrasyon (a/h%)**	**IL-2 SI**	**IFN-γ SI**	**IL-4 SI**	**IL-5 SI**	**TNF-α SI**	**IL-1 SI**
İzoöjenol	-----	1	1	1	1	1	1
	0.5	1.5	1.63	1.89	1.07	6.9	1.49
	1	2.5	1.65	4.10	2.71	3.58	1.15
	5	3.12	2.06	5.55	2.99	1.96	1.07
	10	5.73	5.58	6.15	3.74	1.22	1.19
PABA	-------	1	1	1	1	1	1
	1	1.09	1.08	1.4	1.2	1.08	1.47
	2.5	1.53	1.20	1.45	1.71	1.11	1.56
	5	1.42	1.29	2.01	1.72	1.36	1.61
	10	1.74	1.42	2.22	2.02	1.61	1.25

3.4. Kroton yağı kullanılarak yapılan deneyin sonuçları

3.4.1. Kroton yağı maruziyeti sonucu hesaplanan lenf düğümü ağırlıkları, lenfosit sayıları ve maruziyet öncesi ve sonrası % kulak kalınlıkları değişimi

AOO içerisinde farklı konsantrasyonlarda çözünmüş halde farelerin kulak arkalarına uygulanan irritan bir madde olduğu bilinen kroton yağı ile elde edilen lenf düğümü ağırlıkları, hücre sayıları ve % kulak kalınlığı değişimi Çizelge 3.10' da görüldüğü gibidir. Çözücü olarak uygulanan AOO ile karşılaştırıldığında kroton yağının uygulanan %0.25 ve üstü konsantrasyonlarda farelerin kulak kalınlıklarındaki artışın %25' in üstünde olduğu gözlenmiştir. Negatif kontrol olarak uygulanan PABA ile farelerin belirtilen parametrelerinde anlamlı artışlar olmadığı görülmüştür.

Çizelge 3.10. AOO ile çözünmüş farklı konsantrasyonlardaki kroton yağı ve PABA maruziyeti sonrası farelerin lenf düğümü ağırlıkları, hücre sayıları ve % kulak kalınlıkları değişimi

Kimyasal	**Çözücü**	**Konsantrasyon (a/h%)**	**Lenf düğümü ağırlığı (g)**	**Lenfosit sayısı (10^6/mL)**	**% Kulak kalınlığı değişimi**
Kroton yağı	AOO	-------	0.022 ± 0.002	6.05 ± 2.96	0
		0.05	0.025 ± 0.004	7.04 ±1.69	9
		0.1	0.024 ± 0.004	7.78 ±3.41	18.25
		0.25	0.035 ± 0.010	14.93 ±7.39	25.7
		0.5	0.040 ± 0.023	20.48 ±9.01	28
PABA	AOO	-------	0.022 ± 0.002	6.05 ± 2.96	0
		1	0.023 ± 0.013	6.20 ± 2.25	0
		2.5	0.020 ± 0.010	6.14 ± 1.12	0
		5	0.024 ± 0.007	6.22 ± 2.22	0
		10	0.026 ± 0.007	6.27 ± 2.22	10

3.4.2. Kroton yağı maruziyeti sonucu hesaplanan optik dansite (OD) ve stimülasyon indeksi (SI) değerleri

AOO içinde çözünmüş kroton yağı uygulanan her bir gruba ait ortalama OD_{450} değerleri ile OD_{450} değerlerinin sadece çözücü (AOO) uygulanmış kontrol grubuna ait ortalama OD_{450} değerine oranı ile hesaplanan SI değerleri Çizelge 3.11' de gösterilmiştir. İrritan bir madde olduğu bilinen kroton yağının uygulanan dozlarda hesaplanan OD_{450} ve SI değerlerinde sadece AOO uygulanan kontrol grubuna göre önemli artışlar oluşturmadığı görülmektedir. Kroton yağının SI değerinin uygulanan en yüksek konsantrasyonda bile 3' ten küçük olduğu gözlenmiştir.

Çizelge 3.11. AOO ile çözünmüş farklı konsantrasyonlardaki kroton yağı ve PABA maruziyeti sonrası hesaplanan Optik Dansite ve Stimülasyon İndeksi değerleri

Kimyasal	**Çözücü**	**Konsantrasyon (a/h%)**	**OD_{450}**	**SI**
Kroton yağı	AOO	-------	0.07	1
		0.05	0.11	1.57
		0.1	0.11	1.57
		0.25	0.12	1.71
		0.5	0.12	1.71
PABA	AOO	-------	0.07	1
		1	0.11	1.62
		2.5	0.12	1.66
		5	0.12	1.81
		10	0.17	2.46

3.4.3. Kroton yağı uygulanan farelerin kulak arkası lenf düğümlerinden elde edilen lenfosit hücre kültürlerindeki sitokin düzeyleri

AOO içerisinde çözünmüş kroton yağı ve PABA' nın farklı konsantrasyonlarının farelere lokal olarak uygulanması sonucu farelerin çıkarılan lenf düğümlerinden salınan sitokinlerden birkaçı ölçülmüştür. Bunlardan IL-2, IFN-γ, IL-4, IL-5, TNF-α ve IL-1 SI değerleri Çizelge 3.12' de gösterildiği gibidir. Çözücü olarak kullanılan AOO' e göre kroton yağının ölçülen bütün sitokin düzeylerinde değişiklik oluşturduğu görülse de bu değişikliklerin doza bağımlı olmaksızın gerçekleştiği görülmektedir. Uygulanan %0.5 kroton yağı yalnızca IL-1' de bir anlamlılık gözlenmiştir. Aşağıdaki çizelgede de görüldüğü gibi sitokin düzeylerinde doza bağlı olmaksızın değişimler gerçekleşmiştir.

Çizelge 3.12. AOO ile çözünmüş farklı konsantrasyonlardaki kroton yağı ve PABA maruziyeti sonrası ölçülen sitokin düzeyleri

Kimyasal	Konsantrasyon (a/h%)	IL-2 SI	IFN-γ SI	IL-4 SI	IL-5 SI	TNF-α SI	IL-1 SI
Kroton yağı	-------	1	1	1	1	1	1
	0.05	1.78	1.02	1.25	1.55	2.71	1.02
	0.1	2.57	4.65	3.33	2.50	3.30	1.33
	0.25	1.5	6.11	2.25	1.72	2.95	1.32
	0.5	2.45	5.42	4.41	2.43	3.45	1.93
PABA	-------	1	1	1	1	1	1
	1	1.09	1.08	1.4	1.2	1.08	1.47
	2.5	1.53	1.20	1.45	1.71	1.11	1.56
	5	1.42	1.29	2.01	1.72	1.36	1.61
	10	1.74	1.42	2.22	2.02	1.61	1.25

3.5. SLS kullanılarak yapılan deneyin sonuçları

3.5.1. SLS maruziyeti sonucu hesaplanan lenf düğümü ağırlıkları, lenfosit sayıları ve maruziyet öncesi ve sonrası % kulak kalınlıkları değişimi

AOO içerisinde farklı konsantrasyonlarda çözünmüş halde farelerin kulak arkalarına uygulanan irritan bir madde olduğu bilinen SLS ile elde edilen lenf düğümü ağırlıkları, hücre sayıları ve % kulak kalınlığı değişimi Çizelge 3.13' te görüldüğü gibidir. Çözücü olarak uygulanan AOO ile karşılaştırıldığında SLS' in uygulanan %0.5 konsantrasyonda farelerin kulak kalınlıklarındaki artışın %26 olduğu gözlenmiştir. Negatif kontrol olarak uygulanan PABA ile farelerin belirtilen parametrelerinde anlamlı artışlar olmadığı görülmüştür.

Çizelge 3.13. AOO ile çözünmüş farklı konsantrasyonlardaki SLS ve PABA maruziyeti sonrası farelerin lenf düğümü ağırlıkları, hücre sayıları ve % kulak kalınlıkları değişimi

Kimyasal	**Çözücü**	**Konsantrasyon (a/h%)**	**Lenf düğümü ağırlığı (g)**	**Lenfosit sayısı (10^6/mL)**	**% Kulak kalınlığı değişimi**
SLS	AOO	-------	0.022 ± 0.002	6.05 ± 2.96	0
		0.05	0.023 ± 0.010	7.62 ± 3.25	6.25
		0.1	0.021 ± 0.009	11.95 ±6.91	9.1
		0.25	0.027 ± 0.009	12.9 ± 5.03	13
		0.5	0.048 ± 0.014	14.06 ±3.25	26
PABA	AOO	-------	0.022 ± 0.002	6.05 ± 2.96	0
		1	0.023 ± 0.013	6.20 ± 2.25	0
		2.5	0.020 ± 0.010	6.14 ± 1.12	0
		5	0.024 ± 0.007	6.22 ± 2.22	0
		10	0.026 ± 0.007	6.27 ± 2.22	10

3.5.2. SLS maruziyeti sonucu hesaplanan optik dansite (OD) ve stimülasyon indeksi (SI) değerleri

AOO içinde çözünmüş SLS uygulanan her bir gruba ait ortalama OD_{450} değerleri ile OD_{450} değerlerinin sadece çözücü (AOO) uygulanmış kontrol grubuna ait ortalama OD_{450} değerine oranı ile hesaplanan SI değerleri Çizelge 3.14' te gösterilmiştir. İrritan bir madde olduğu bilinen SLS' in uygulanan dozlarda hesaplanan OD_{450} ve SI değerlerinde sadece AOO uygulanan kontrol grubuna göre bir miktar artış oluşturduğu görülmektedir. SI değeri yalnızca uygulanan en yüksek doz olan %0.5 konsantrasyonda 4.28 olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 3.14. AOO ile çözünmüş farklı konsantrasyonlardaki SLS ve PABA maruziyeti sonrası hesaplanan Optik Dansite ve Stimülasyon İndeksi değerleri

Kimyasal	**Çözücü**	**Konsantrasyon (a/h%)**	**OD_{450}**	**SI**
SLS	AOO	-------	0.07	1
		0.05	0.07	1
		0.1	0.11	1.57
		0.25	0.15	2.14
		0.5	0.30	4.28
PABA	AOO	-------	0.07	1
		1	0.11	1.62
		2.5	0.12	1.66
		5	0.12	1.81
		10	0.17	2.46

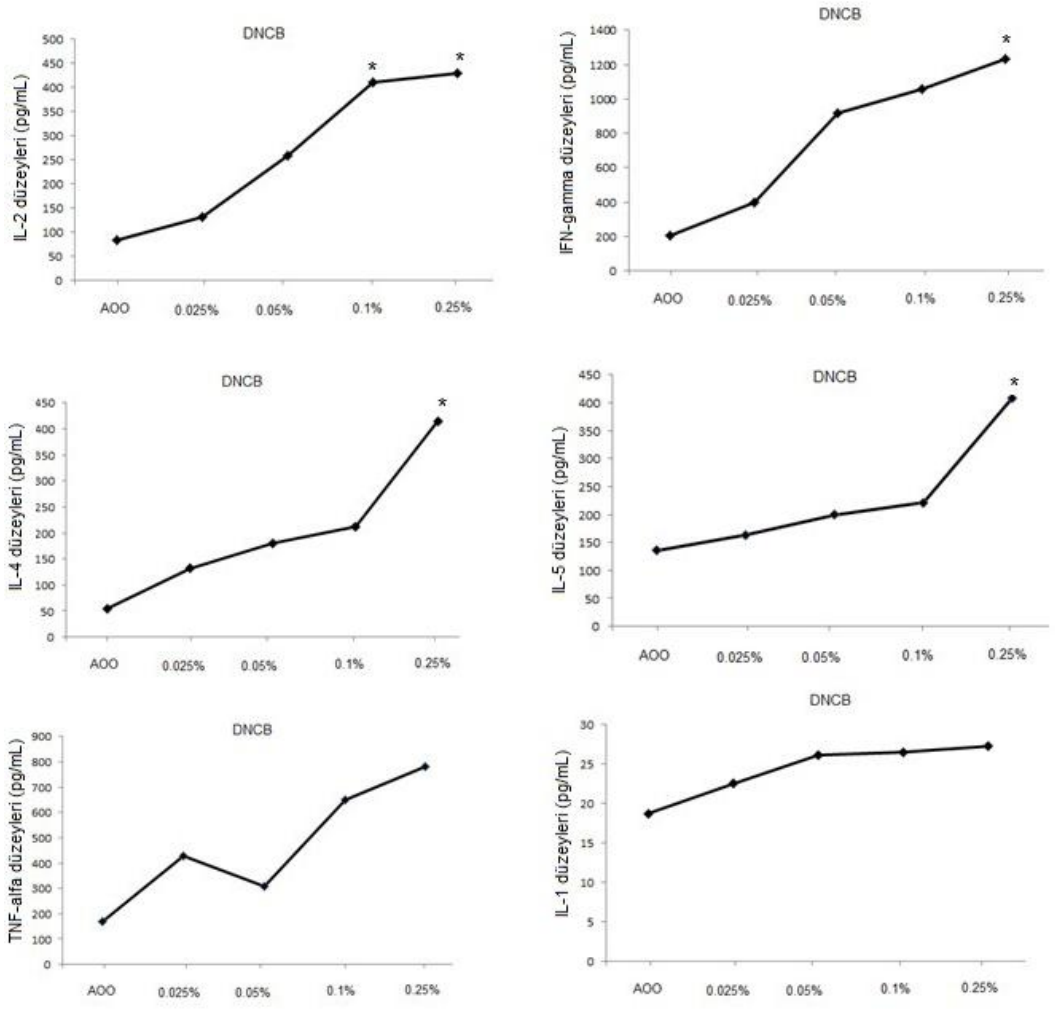
3.5.3. SLS uygulanan farelerin kulak arkası lenf düğümlerinden elde edilen lenfosit hücre kültürlerindeki sitokin düzeyleri

AOO içerisinde çözünmüş SLS ve PABA' nın farklı konsantrasyonlarının farelere lokal olarak uygulanması sonucu farelerin çıkarılan lenf düğümlerinden salınan sitokinlerden birkaçı ölçülmüştür. Bunlardan IL-2, IFN-γ, IL-4, IL-5, TNF-α ve IL-1 SI değerleri Çizelge 3.15' te gösterildiği gibidir. Çözücü olarak kullanılan AOO' e göre IL-2 ve IL-4 düzeylerinde doza bağlı olmaksızın anlamlılıklar gözlenmiştir. Düşük konsantrasyonlarda SLS uygulansa bile bütün sitokin düzeylerinde doza bağlı olmaksızın artış ya da azalışlar gerçekleştiği görülmektedir.

Çizelge 3.15. AOO ile çözünmüş farklı konsantrasyonlardaki SLS ve PABA maruziyeti sonrası ölçülen sitokin düzeyleri

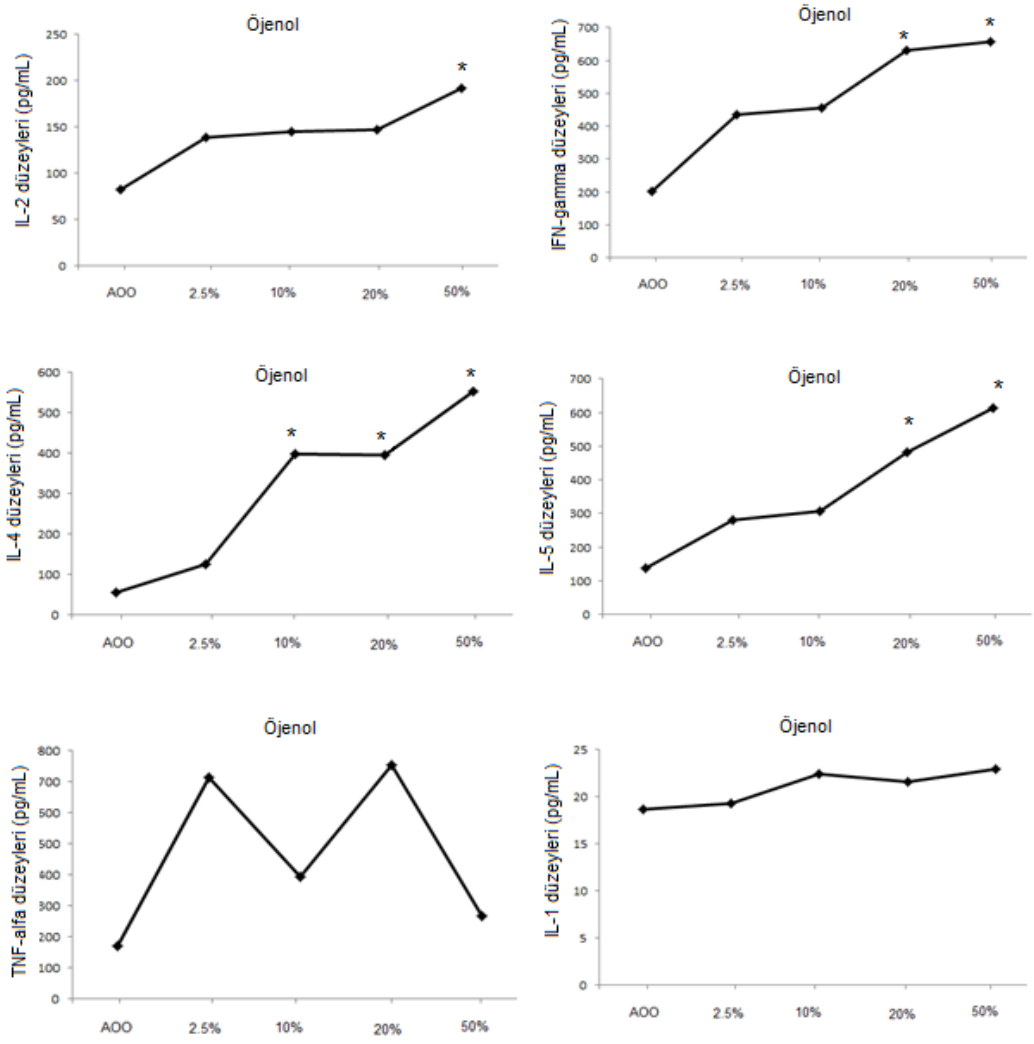
Kimyasal	Konsantrasyon (a/h%)	IL-2 SI	IFN-γ SI	IL-4 SI	IL-5 SI	TNF-α SI	IL-1 SI
SLS	-------	1	1	1	1	1	1
	0.05	4.09	5.34	6.18	2.78	3.40	1.29
	0.1	4.91	6.74	3.42	2.5	3.42	1.98
	0.25	4.74	3.70	8.28	2.44	3.40	1.26
	0.5	1.72	1.76	2.87	1.97	1.91	1.18
PABA	-------	1	1	1	1	1	1
	1	1.09	1.08	1.4	1.2	1.08	1.47
	2.5	1.53	1.20	1.45	1.71	1.11	1.56
	5	1.42	1.29	2.01	1.72	1.36	1.61
	10	1.74	1.42	2.22	2.02	1.61	1.25

3.6. Sadece AOO uygulanan ve farklı konsantrasyonlarda AOO içinde çözünen DNCB, öjenol, izoöjenol, kroton yağı, SLS ve PABA uygulanan 8-12 haftalık dişi Balb/c farelerin kulak arkası lenf düğümlerinden elde edilen hücrelerden salınan sitokin düzeylerinin grafikler ile gösterimi



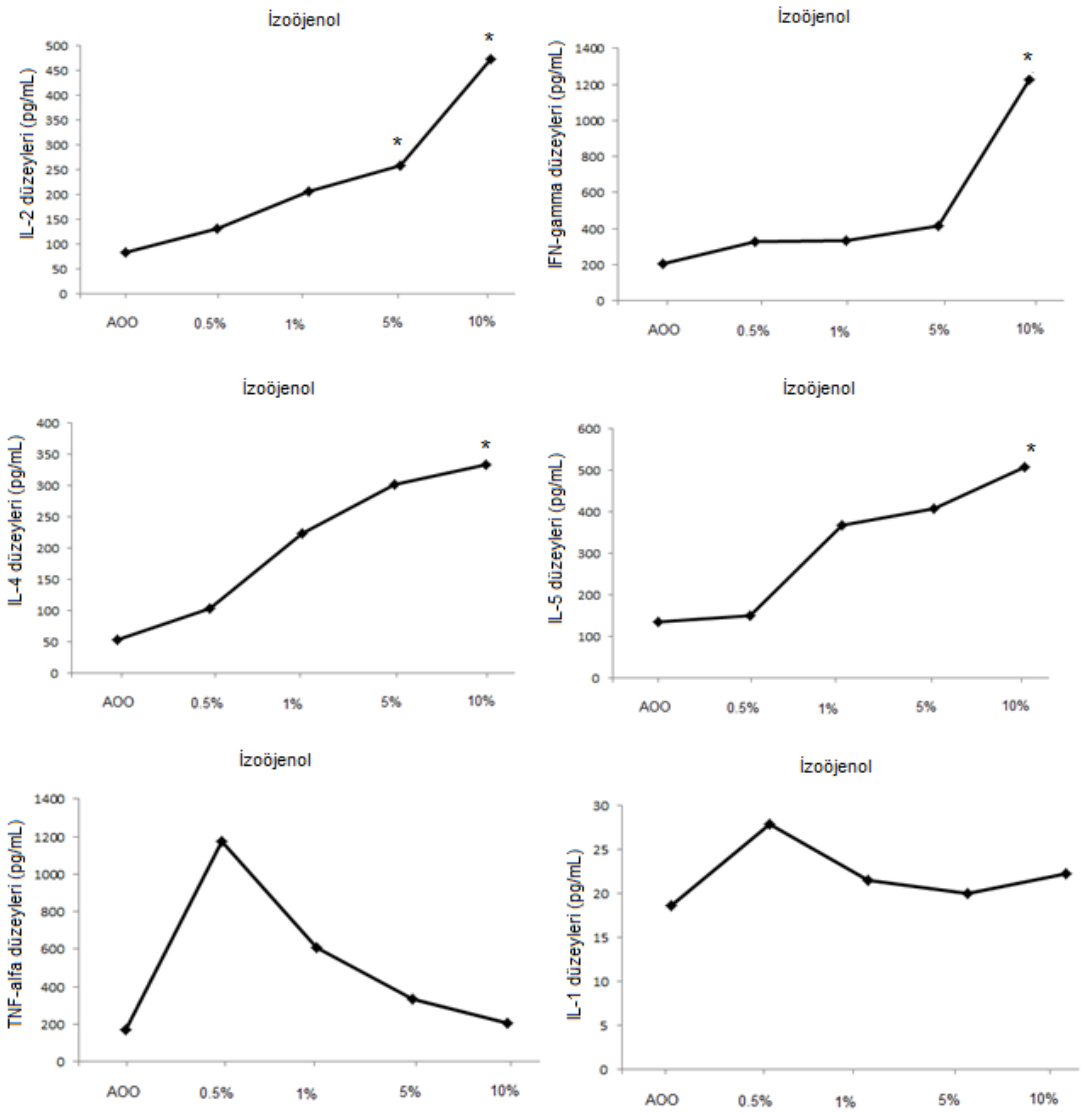
Şekil 3.1. Sadece AOO uygulanan ve farklı konsantrasyonlarda AOO içinde çözünen DNCB uygulanan 8-12 haftalık dişi Balb/c farelerin kulak arkası lenf düğümlerinden elde edilen hücrelerden salınan sitokin düzeylerinin grafikler ile gösterimi.

*p<0,01; kontrol grubuna göre istatiksel olarak anlamlı farklılık (Dunnett's test)



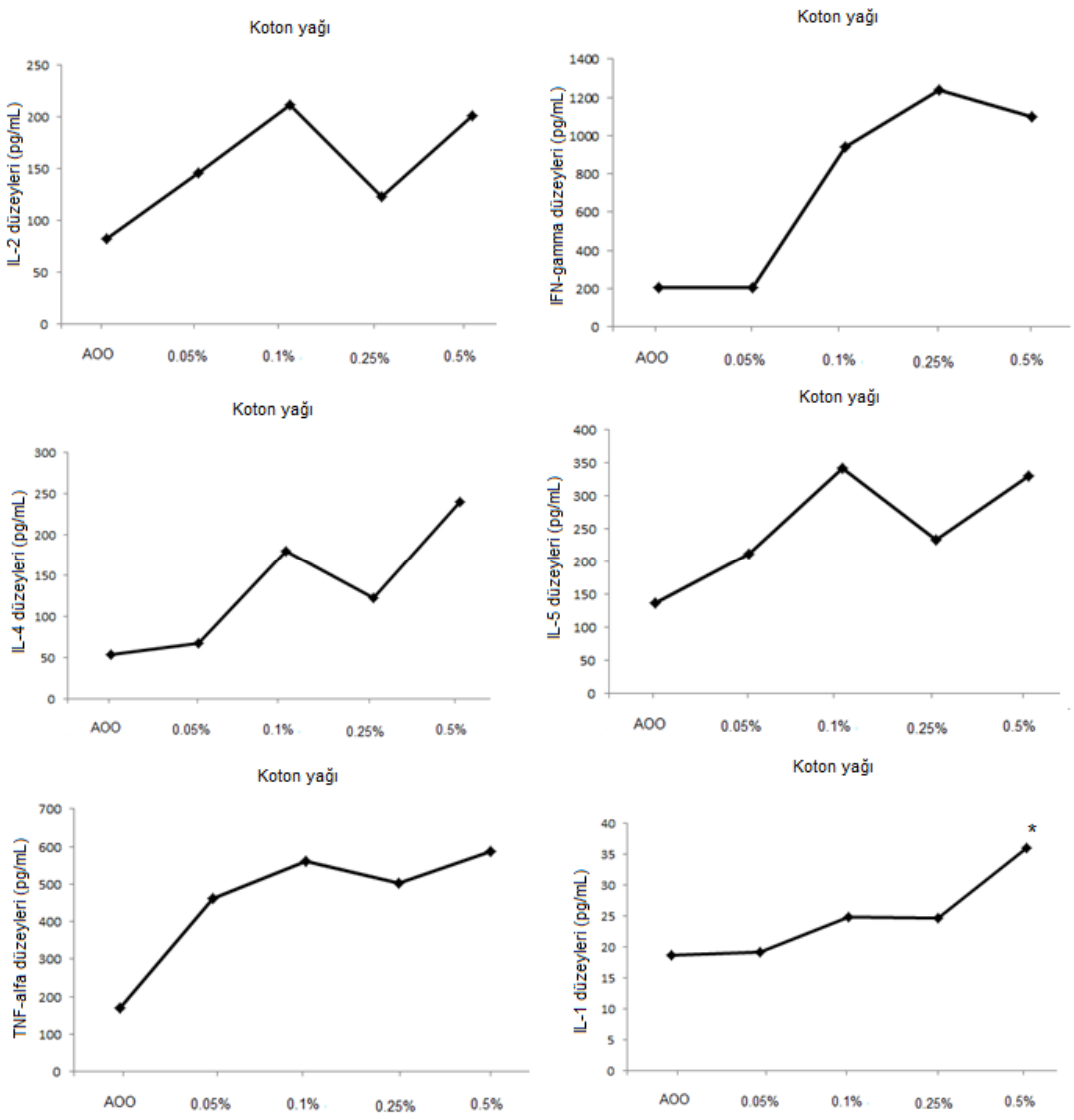
Şekil 3.2. Sadece AOO uygulanan ve farklı konsantrasyonlarda AOO içinde çözünen öjenol uygulanan 8-12 haftalık dişi Balb/c farelerin kulak arkası lenf düğümlerinden elde edilen hücrelerden salınan sitokin düzeylerinin grafikler ile gösterimi.

*p<0,01; kontrol grubuna göre istatiksel olarak anlamlı farklılık (Dunnett's test



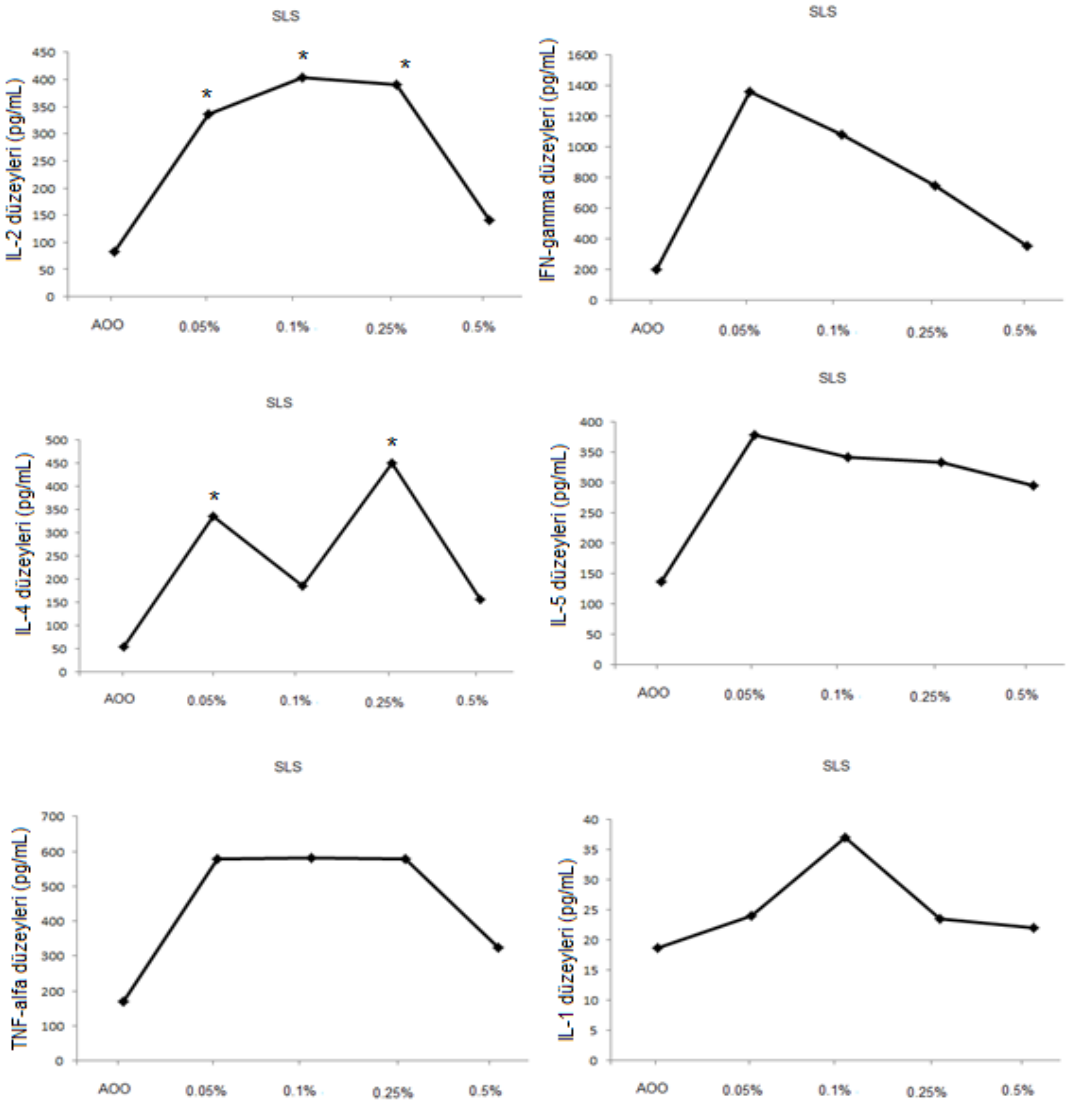
Şekil 3.3. Sadece AOO uygulanan ve farklı konsantrasyonlarda AOO içinde çözünen izoöjenol uygulanan 8-12 haftalık dişi Balb/c farelerin kulak arkası lenf düğümlerinden elde edilen hücrelerden salınan sitokin düzeylerinin grafikler ile gösterimi.

*p<0,01; kontrol grubuna göre istatiksel olarak anlamlı farklılık (Dunnett's test



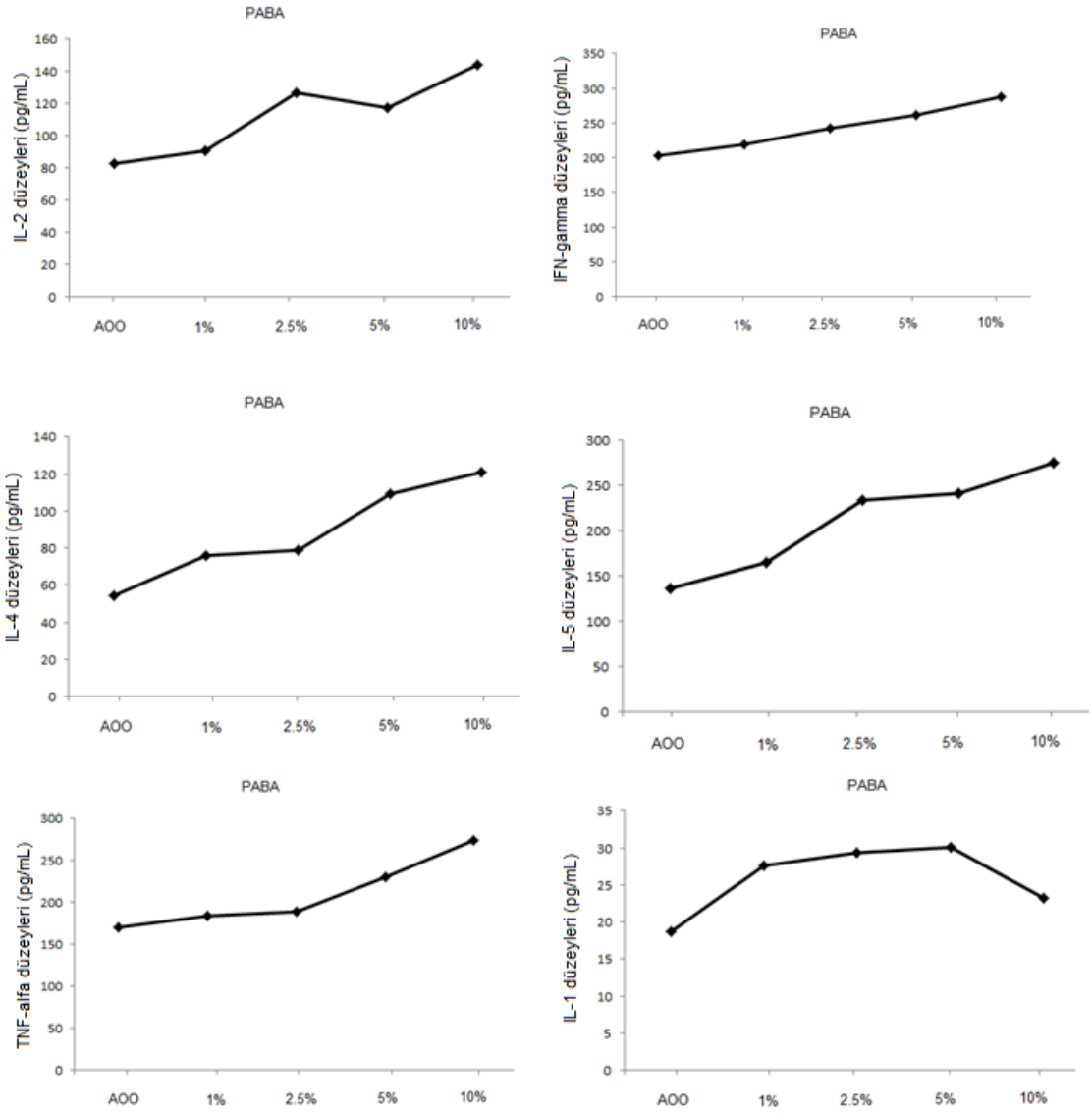
Şekil 3.4. Sadece AOO uygulanan ve farklı konsantrasyonlarda AOO içinde çözünen kroton yağı uygulanan 8-12 haftalık dişi Balb/c farelerin kulak arkası lenf düğümlerinden elde edilen hücrelerden salınan sitokin düzeylerinin grafikler ile gösterimi.

*p<0,01; kontrol grubuna göre istatiksel olarak anlamlı farklılık (Dunnett's test



Şekil 3.5. Sadece AOO uygulanan ve farklı konsantrasyonlarda AOO içinde çözünen SLS uygulanan 8-12 haftalık dişi Balb/c farelerin kulak arkası lenf düğümlerinden elde edilen hücrelerden salınan sitokin düzeylerinin grafikler ile gösterimi.

*p<0,01; kontrol grubuna göre istatiksel olarak anlamlı farklılık (Dunnett's test



Şekil 3.6. Sadece AOO uygulanan ve farklı konsantrasyonlarda AOO içinde çözünen PABA uygulanan 8-12 haftalık dişi Balb/c farelerin kulak arkası lenf düğümlerinden elde edilen hücrelerden salınan sitokin düzeylerinin grafikler ile gösterimi.

*p<0,01; kontrol grubuna göre istatiksel olarak anlamlı farklılık (Dunnett's test

5. TARTIŞMA

Alerjik ve irritan kontakt dermatit çok sık karşılaşılan deri problemlerindendir. Günümüzde kullanılan kimyasalların sayı ve çeşit bakımından artış göstermesi bu deri hastalıklarıyla karşılaşma risklerini de artırmaktadır. Kullanılan kimyasalların deri hassasiyetini ölçmek için uzun yıllar çeşitli kobay testlerinden yararlanılmıştır. Fakat son yıllarda özellikle hayvan refahının gözetildiği testler, kullanılan hayvan sayısı az olan ve hayvanlara daha az travma veren uygulamalar tercih edilmektedir. Bu sebeple kimyasalların deri hassasiyetini ölçmek için çalışmamızda, Prof. Dr. Asuman Karakaya tarafından yönetilen bir TÜBİTAK projesi kapsamında Dr. Ülker'in doktora tezinde modifiye edilen, *ex vivo* BrdU:LLNA-ELISA yöntemi kullanılmıştır. Valide olmuş LLNA yönteminin en önemli dezavantajı olan radyoaktif bir yöntemle hücre proliferasyonunun ölçülmemesi *ex vivo* LLNA yönteminin en önemli avantajıdır.

Biz de bu çalışmamızda *ex vivo* LLNA yöntemini kullandık. Bu yöntemle ilgili olarak 3 tane kantitatif sonuç noktasını göz önünde bulundurarak sonuçlarımızı değerlendirdik. Bu sonuç noktaları lenfosit proliferasyonu ve stimülasyon indeksi, % kulak kalınlık değişimleri ve ölçülen sitokin profilleridir. Lenf düğümleri ile ilgili sonuçlar, hem alerjen hem de irritan kimyasalların yüksek dozlarının uygulanmasıyla lenf düğümü hücrelerinde ve lenf düğümü ağırlıklarında artış olduğunu göstermiştir. Bu sonuçlara dayanarak, kullanılan kimyasalların lokal uygulanmasından sonra yalnızca alerjen kimyasalların değil irritan kimyasalların da lenf düğümlerini stimüle ettiği söylenebilir.

Radyoaktif LLNA yöntemi ile Basketter ve arkadaşları tarafından (2007) DNCB ile yapılan çalışmalarda SI değerinde 3 kat artışa neden olan konsantrasyon (EC3) %0,04 olarak hesaplanmıştır. Takeyoshi ve arkadaşları (2006) ise radyoaktif olmayan LLNA yöntemi ile SI değerini 3 kat artıran DNCB konsantrasyonunu %0,1 olarak bulmuş ve radyoaktif olmayan yöntemin radyoaktif yönteme göre daha az duyarlı olduğunu belirtmişlerdir. Takeyoshi ve arkadaşlarının geliştirdikleri yöntemin uygulamasında 5. gün lenf düğümleri çıkarıldıktan sonra, hücre proliferasyonunun ölçümüne kadar -20^{o}C' de bekletilmesi söz konusudur. Bu durum lenfosit eldesinde taze numune ile çalışmanın önemine ters düşmektedir. Bu sebeple çalışmamız kapsamında, lenf düğümlerinin çıkarıldığı gün lenfositler elde edilmiş ve lenfosit proliferasyonu ölçülmüştür. Ayrıca BrdU enjeksiyonu ile işaretleme basamağı hayvan refahı göz önünde bulundurularak kaldırılmış, *ex vivo* ortamda BrdU işaretlemesi yapılarak sonuçlar elde edilmiştir. Bu değişikliklerden sonra DNCB için SI değerininin 3 kat artışına sebep olan konsantrasyon %0,05 olarak tespit edilmiştir. Bu değerin valide olmuş LLNA yöntemi ile oldukça uyumlu olduğu ve radyoaktif olmayan LLNA yönteminin radyoaktif LLNA yöntemi kadar duyarlı olabileceği görülmüştür.

LLNA kapsamında uygulanan maddelerin, pozitif cevap verdiğini kabul etmek için hesaplanan SI değerinin 3' ten büyük olması gerekir. Bu yoruma dayanarak uyguladığımız *ex vivo* BrdU:LLNA-ELISA ile, uygulanan alerjen kimyasallar olan DNCB, izoöjenol ve öjenolün lenf düğümü hücre proliferasyonunda düşük konsantrasyonlarda bile SI değerinde 3 kat artış oluşturduğu görülmüştür. Uyguladığımız *ex vivo* yöntemle hesaplanan SI değerleri, bu maddelerin alerjen olduklarını göstermiştir. Fakat irritan bir madde olduğu bilinen kroton yağı ve negatif kontrol amaçlı kullanılan PABA uygulamalarından sonra SI değerlerinde 3 kat artış görülmemiştir. Ancak SLS' nin yalnızca uygulanan en yüksek konsantrasyonunda SI değerinin 3' ten büyük

olduğu gözlenmiştir. Bazı yayınlarda SLS' ın kontakt alerjen etkilerinin olduğu rapor edilse de (Woolhiser ve ark., 1998), birçok araştrmacı ve dermatolog tarafından SLS' ın bir irritan madde olduğu düşünülmektedir. Bu sonuçlar; çalışmamız kapsamında irritan kimyasallar ile alerjen kimyasallar arasındaki farklılıkları uyguladığımız yöntemle ortaya koyabileceğimizi göstermektedir.

Kroton yağı ile ilgili olarak hayvanlar üzerinde uygulanmış mevcut bir literatür bulunmasa da düşük dozlarda irritan etkileri olduğu ayrıca kokarsinojenik özellikte bir madde olduğu bilinmektedir. Çalışmamızın ikinci sonuç noktası olarak değerlendirilen kulak kalınlıkları değişimi sonuçlarına göre; kroton yağı ve SLS' ın % 0,25 ve % 0,5 konsantrasyonlarında irritan potansiyellerine sahip olduğu bulunmuştur.

EFSA FEEDAP Panel; izoöjenolün özellikle solunum sistemi, deri ve göz üzerine irritan etkili olduğunu düşünmektedir ve EFSA 2011 literatürlerinde izoöjenol bir deri ve solunum sistemi alerjeni olarak geçmektedir. Bu çalışmalarla uyumlu olarak bizim çalışmamızda da; SI değerinin %5 konsantrasyonda 3' ten büyük olarak hesaplanması izoöjenolün alerjen bir kimyasal olduğunu göstermiştir. Ancak uygulanan %10 konsantrasyonda kulak kalınlığındaki artışın %25'ten büyük olmasından dolayı izoöjenolün yüksek konsantrasyonlarda ayrıca irritan etkisinin de olabileceği görüşünü desteklemektedir. Bu sonuçlar daha önce yapılmış olan çalışmalarla da uyumlu olarak bulunmuştur (Wright ve ark., 2001; Piccotti ve Kawabata, 2008; EFSA FEEDAP Panel, 2011).

Sitokin seviyelerindeki artışlar kontakt alerjinin ortaya çıkmasında ve indüksiyonunda rol alan T helper hücre proliferasyonu ile ilişkilidir. Günümüzde Th1 ve Th2 sitokinleri tarafından regüle edilen kontakt sensitizasyon üzerine yoğun olarak çalışılmaktadır. Var olan bulgular

gösteriyor ki; yalnızca Th1 sitokinleri yani IL-2 ve IFN-γ değil, Th2 sitokinleri yani IL-4 ve IL-5 de kontakt alerjinin ortaya çıkmasında önemli rol oynamaktadır (Azam ve ark., 2005; Itakura ve ark., 2006; Ulker ve ark., 2011).

Erken evrede hem irritan kontakt dermatit hem de alerjik kontakt dermatitte IL-1 ve TNF-α doğal immün cevabı indüklerken, irritan kontakt dermatitin ileri evresinde deri enflamasyonu özellikle immün cevaba bağlı olarak devam eder. Fakat alerjik kontakt dermatitte, kazanılmış immün yanıt olarak antijen-spesifik T hücreleri deri enflamasyonunu artırmak için devreye girerler (Meller ve ark., 2007). Bizim çalışmamızda da sitokin profilleri yapılan diğer çalışmalarla uyumlu bulunmuştur. İrritan kontakt dermatitte sitokin aktivasyon aşamalarının önemi henüz tam olarak anlaşılamamış olsa da, büyük ihtimalle irritan maruziyeti ile ortaya çıkan primer sitokinler olan IL-1 ve TNF-α 'nın diğer sitokinleri indüklemesi ile alakalı olduğu düşünülmektedir.

Bu çalışmada, gruplara uygulanan alerjen kimyasallar ile elde edilen sitokin düzeyleri sonuçları (IL-2, IFN-γ, IL-4 ve IL-5) bizi net bir doz-cevap ilişkisi eğilimi olma ihtimalini düşünmeye yönlendirmiştir. Bulgularımız önceki çalışmalar ile de uyumlu bulunmuştur (Ulker ve ark., 2011, 2014). Diğer bir yandan bu gruplarda IL-1 ve TNF-α için bir doz-cevap ilişkisi gözlemlenmemiştir. Alerjen kimyasallardan farklı olarak irritan kimyasalların uygulandığı grupların sitokin düzeylerinde açık bir doz-cevap ilişkisi görülmemiş olup, sitokinlerin konsantrasyon düzeyine bağlı olmaksızın dağınık bir profil çizdikleri görülmüştür. Bu sonucun kimyasalların sitokin profillerine bakarak o kimyasalın alerjen etkili mi yoksa irritan etkili mi olduğu yorumunun yapılabileceği düşünülmektedir.

Balb/C farelerine PABA maruziyetinin, çalışmamızda ölçümü yapılan sitokin düzeylerinde herhangi bir stimülasyon oluşturmadığı gözlenmiştir. PABA' in LLNA çalışmalarında negatif kontrol amaçlı kullanılmasından dolayı, bu bulgular beklenildiği gibi sonuçlanmıştır.

Bulgularımıza göre; çok çeşitli salınan sitokinler arasında IL-2, IFN-γ, IL-4 ve IL-5 sitokin profilleri, irritan kontakt dermatit ile alerjik kontakt dermatiti birbirinden ayırmaktadır. İrritan maruziyeti sonrası salınan IL-1 ve TNF-α öncül sitokinler olmasına rağmen, lenfositlerden salınan bu sitokinler net bir doz-cevap eğrisi göstermemiştir. Çok sayıda *in vitro* çalışma da, çeşitli irritan kimyasalların indüklemesi ile keratinositlerden IL-1 ve TNF-α salındığını göstermiştir (Hoefakker ve ark., 1995; Grangsjö ve ark., 1996; Effendy ve ark., 2000; Smith Pease ve ark., 2003; Lisby ve Baadsgaard, 2006; De Jongh ve ark., 2007). Keratinositler, irritan kontakt dermatitte immün medyatörlerin üretiminde önemli rol oynarlar. Öte yandan, T lenfositlerinin deri yoluyla infiltrasyonu hala tam olarak bilinmemektedir. Akut irritan kontakt dermatit reaksiyonlarında temel olarak T helper lenfositleri aracılığıyla IL-2 ve IFN-γ düzeyleri artırılarak selüler infiltrasyon oluşmaktadır (Lee ve ark., 2013). Birçok araştırmacı da farelerde oluşan kontakt dermatit sırasındaki sitokin ekspresyon profillerini incelemiş ve IL-2 ve IFN-γ' nın önemini ortaya koymuştur. Hem irritan hem de alerjen maddelerin CBA/N farelere uygulandığı ve lenf düğümlerindeki sitokin mRNA ve protein ekspresyonunun ölçüldüğü bir çalışmada da IL-2, IFN-γ ve IL-4 sitokinlerinin protein ve mRNA cevaplarına bakıldığı zaman, özellikle alerjen maddelerin doz-cevap eğrisi oluşturduğu ve bu sitokinlerin LLNA yöntemi için önemli ve kullanılabilir sonuç noktaları olabileceği ve irritan ve alerjen maddelerin de ayrımında kullanılabileceği yorumu yapılmıştır (Ku ve ark., 2008). Bizim çalışmamızda da irritan kimyasalların düşük

konsantrasyonları uygulanan gruplarda IL-2 ve IFN-γ düzeylerinde artış olduğu görülmüştür. Yine alerjen kimyasalların doz-cevap eğrisi oluşturması diğer çalışmalarla uyumluluk göstermiştir.

Sonuç olarak; irritasyon değerlendirmesinin ve exvivo LLNA:BrdU-ELISA ile kombine edilmiş sonuç noktaları (lenfosit proliferasyonu ve stimülasyon indeksi, % kulak kalınlıkları değişimi ve sitokin profilleri) değerlendirmelerinin, kimyasal maddelerin irritan ve alerjik potansiyellerini ayırt edebilmek için kullanılabilecek bir yöntem olduğunu önerebiliriz.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez kapsamında uygulanan *ex vivo* BrdU:LLNA-ELISA yöntemiyle, irritan kimyasallar ile alerjen kimyasalların farklılıklarını 3 farklı kantitatif sonuç noktasını değerlendirerek ortaya koymak amaçlanmıştır. Elde edilen sonuç noktaları bize, üzerinde çalışılan kimyasalın alerjen mi yoksa irritan mı olduğu yorumu ile birlikte hangi dozda alerjen hangi dozda irritan olduğu yorumunu da yapma olanağı sağlamıştır. Bu yöntemle birlikte valide olmuş radyoaktif LLNA yönteminin dikkat çeken dezavantajları da ortadan kaldırılmıştır. Radyoaktif işaretleme ile lenfosit proliferasyonunun ölçümü pratikte her laboratuar koşulunda yapılamadığından radyoaktif olmayan işaretleme ile lenfosit proliferasyonu ölçümü, yönteme kolaylık ve pratiklik kazandırmıştır. İntraperitonal BrdU enjeksiyon basamağı kaldırılarak da ex vivo işaretleme ile hayvan refahı ön planda tutulmuştur. Lenf düğümleri çıkarıldıktan hemen sonra lenfosit eldesinin taze numune ile yapılması yöntemin hassasiyeti açısından dikkate alınmıştır. Ön planda tutularak yapılan bu uygulamalar ile de radyoaktif LLNA yöntemi sonuçlarıyla uyumlu sonuçlar elde edilmiş olması, yöntem hassasiyeti açısından güvenilir sonuçlar elde ettiğimizi kanıtlamış olup bu durum radyoaktif LLNA yöntemine üstünlük sağlaması açısından da oldukça önem taşımaktadır.

Bunun yanı sıra, sonuç noktası olarak değerlendirdiğimiz bir diğer kriter olan % kulak kalınlıkları değişimleri hesaplanmıştır. Kullanılan alerjik ve irritan kimyasalların farelerde oluşturdukları kulak kalınlıkları değişimleri ile maddelerin irritan etki mi yoksa alerjen etki mi gösterdikleri yorumunu yapabilme sonucuna ulaşılmıştır. Ayrıca alerjen kimyasalların lenfosit proliferasyonu sonucu hesaplanan SI

değerlerinde 3 kat artışa neden olan konsantrasyon (EC3) çok yüksek değilken, irritan kimyasalların SI değerinde 3 kat artışa sebep olabilmesi için çok daha yüksek konsantrasyonlarda uygulama yapmak gerektiği gözlemlenmiştir. Çalışma kapsamında kullandığımız alerjen etkili kimyasallardan izoöjenolün, uygulanan en yüksek konsantrasyonda ölçülen, kulak kalınlıklarındaki artışın %25' ten büyük olması ise bazı alerjen kimyasalların yüksek konsantrasyonlarda irritan etkisinin de olabileceğini göstermiştir.

Ayrıca salınan sitokin düzeyleri profilleri de bir diğer sonuç noktası olarak değerlendirilmiştir. Erken evrede hem alerjen hem irritan kimyasalların primer olarak IL-1 ve TNF-α salınımlarını indükledikleri, ileri evrede ise alerjen kimyasalların doz-cevap eğrisi doğrultusunda IL-2, IL-4, IFN-γ ve IL-5 salınımlarını stimüle ederken, irritan kimyasalların uygulanan dozdan bağımsız olarak bu sitokinleri indükleri gözlemlenmiştir.

EINECS (European Inventory of Existing Commercial Chemical Substances) envanterinde olan 100.000' i aşkın kimyasalın günümüzde 30.000 kadarı kullanımdadır. Bir yandan modern yaşamın sürdürülmesinde kimyasalların artan miktarlarda kullanılma gerekliliği, diğer yandan bunların yarattığı tehlikeler, kimyasalların üretim öncesi ve sonrası zararlılık limitlerinin belirlenmesinde ve yaratabilecekleri sağlık risklerinin saptanmasında gerekli olan toksisite testlerinin önemini arttırmıştır. Akut toksisite, deri hassasiyeti, deri irritasyonu, deri absorpsiyonu, tekrarlanan doz toksisitesi, mutajenite ve genotoksisite, tüm kimyasallar için yapılması gerekli testlerdir. Fakat Avrupa Birliğine uyum sürecinde olan ülkemizde, toksisite çalışmaları ile ilgili önemli eksiklikler mevcuttur. Kurulan bu yöntem, ülkemizde bu kapsamda ortaya çıkabilecek gereksinimlerin karşılanmasına olanak sağlayacak, henüz toksisiteleri araştırılmamış birçok kimyasal maddenin alerji ve

irritasyon potansiyellerinin araştırılarak risklerin değerlendirilmesine, kabul edilebilir limitlerin önerilmesine ve kozmetik ürünlerle ilgili regülasyonlarının hazırlanmasına olanak sağlayacaktır. Ayrıca tek bir yöntem uygulanarak tüm bu değerlendirilmelerin yapılabilmesi de hem maddi hem de zaman açısından sağlık otoritelerine kolaylık sağlayacaktır.

ÖZET

Radyoaktif Olmayan Lokal Lenf Düğümü Yöntemi Kullanılarak Alerjik Potansiyelleri Olan Kimyasalların İrritan Kimyasallarla Farklılıklarının Değerlendirilmesi

Ex vivo bromodeoksiuridin lokal lenf düğümü yöntemi (ex vivo BrdU:LLNA) kullanılarak, irritan maddeler olan sodyum lauril sülfat ve kroton yağı ile alerjik potansiyelleri olan dinitroklorobenzen, izoöjenol ve öjenolün çözücü içindeki değişik konsantrasyonlarının, 8-12 haftalık dişi Balb/c farelere uygulanması ve kantitatif sonuç noktaları olan lenfosit proliferasyonu ve stimülasyon indeksi, % kulak kalınlıkları değişimi ve salınan sitokinlerin ölçülerek alerjik ve irritan maddelerin ayrımının yapılması ve sonuçların değerlendirilmesi projenin temel konusunu oluşturmaktadır. Bu kapsamda radyoaktif LLNA yönteminin dezavantajları ortadan kaldırılarak radyoaktif madde kullanılmamış ve elde edilen sonuç noktaları ile de maddelerin irritasyon ve alerji potansiyelleri ayrımı yapılabilmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlar da radyoaktif LLNA yöntemi ile uyumluluk göstermektedir. Her iki grup madde maruziyeti sonucu lenfosit proliferasyonunda artış gözlense de, alerjen kimyasalların düşük dozlarında bile lenfosit proliferasyonu sonucu hesaplanan SI değerlerinin 3'ten büyük olduğu, irritan kimyasalların ancak yüksek dozlarında SI değerinin 3'ten büyük olabileceği gözlemlenmiştir. Kulak kalınlıkları değişimi, irritan maddelerde düşük konsantrasyonlarda bile %25' in üstünde iken, alerjen maddelerde bu değişim anlamlı bir artış göstermemiştir. Ölçülen sitokin düzeyleri sonucu erken evrede hem irritan hem alerjen kimyasallara maruziyet sonucu IL-1 ve TNF-α salınımlarında artış görülmüştür. İleri evrede IL-2, IL-4, IFN-γ ve IL-5 salınımları ise, alerjen kimyasallara maruziyette doz-cevap ilişkisine bağlı olarak artış gösterirken, irritan kimyasallara maruziyette herhengi bir doza bağlı olmaksızın değişim gösterdiği gözlenmiştir. İrritan ve alerjen kimyasalların ayrımının yapılabilmesi için bu yöntemden yararlanabileceği sonucuna ulaşılmıştır.

Anahtar Kelimeler: alerjik kontakt dermatit, DNCB, *ex vivo* BrdU:LLNA, irritan kontakt dermatit, izoöjenol, kroton yağı, öjenol, sitokinler, SLS , % kulak kalınlıkları değişimi.

SUMMARY

Evaluation of Some Chemicals Have Allergic Potential Difference With Irritant Chemicals by Using Non-Radioactive Local Lymph Node Assay

By using *ex vivo* bromodeoxyuridine local lymph node assay, sodium lauryl sulfate and croton oil which are irritant substances and having allergenic potential with dinitrochlorobenzene, isoeugenol and eugenol of different concentrations in the solvent on 8-12 weeks old female Balb/c mice, measuring quantitative endpoints; lymphocyte proliferation and stimulation index, % change in ear thickness and the release of cytokines and comparison of allergic and irritant substances and evaluation of endpoints has been constituted the main topics of the project. In this context, it was eliminated the disadvantages of radioactive LLNA and radioactive substances was not used and also could have been made distinction of the irritation and allergy potential of substances by obtained endpoints. The results obtained are consistent with radioactive LLNA. Although the increase observed in lymphocyte proliferation result of both exposure of substances, even low doses of allergen chemicals calculated SI value was greater than 3 as a result of the lymphocyte proliferation, but SI values were observed to be greater than 3 in only high levels of irritant chemicals. When ear thickness change was higher than 25% even at low concentrations in irritants, but in allergen substances this change did not demonstrate a significant increase. At an early stage as a result of measured stokin levels and exposure of both irritant and allergen chemicals, it was seen an increase in IL-1 and TNF-α releases. At a next stage, while IL-2, IL-4, IFN- and IL-5 releases were increasing in exposure to allergen chemicals depending on the dose-response relation, exposure to irritant chemicals, were observed changes without any dose-dependent. It was reached to result that it can be benefit from this method to distinct irritant and allergen chemicals.

Key words: alergic contact dermatitis, croton oil, cytokines, DNCB, *ex vivo* BrdU:LLNA, eugenol, irritant contact dermatitis, isoeugenol, SLS, % change in ear thickness.

KAYNAKLAR

ANDERSON, S.E., SIEGEL, P.D., MEADE, B.J. (2011). The LLNA: A brief review of recent advances and limitations. J. Allergy, 2011; doi:10.55/2011/42403.

ALE, I.S., MAIBACHT, H.A. (2010). Diagnostic approach in allergic and irritant contact dermatitis. Expert Rev. Clin. Immunol., 6; 291-310.

AZAM, P., PEIFFER, J.L., OURLIN, J.C., BONNET, P.A., TISSIER, M.H., VIAN, L., FABRE, I. (2005). Qualitive and quantative evaluation of a local lymph node assay based on ex vivo interleukin-2 production. Toxicology, 206: 285-298.

BASKETTER, D.A., GERBERICK, G.F., KIMBER, I. (2007). The local lymph node assay : current position in the regulatory classification of skin sensitizing chemicals. Cutan. Ocul. Toxicol., 26: 293–301.

BERARD, F., MARTY, J.P., NICOLAS, J.F. (2003). Allergen penetration through the skin. Eur. J. Dermatol., 13: 324-330.

BERARDESCA, E., DISTANTE, F. (1994). The modulation of skin irritation. Contact Dermatitis, 31, 281-287.

BETTS, C.J., DEARMAN, R.J., HEYLINGS, J.R., KIMBER, I., BASKETTER, D.A. (2006). Skin sensitization potency of methyl methacrylate in the local lymph node assay: comparisons with guinea-pig data and human experience. Contact Dermatitis, 55: 140-147.

BOSSIQUET-LEROUX, C., DURAND-CABAGNA, G., HERLIN, H. and HELDER, D. (1995). Evaluation of lymphocyte proliferation by immunohistochemistry in the local lymph node assay. J. Appl. Toxicol., 15, 465-475.

COCKSHOTT, A., EVANS, P., RYAN, C.A., GERBERICK, G.F., BETTS, C.J., DEARMAN, R.J., KIMBER, I., BASKETTER, D.A. (2006). The local lymph node assay in practice: a current reguatory perspective. Hum. Exp. Toxicol., 25: 387-394.

CORSINI, E., GALLI, C.L. (1998). Cytokines and irritant contact dermatitis. Toxicol. Lett., 102-103:277-282.

CORSINI, E., TERZOLI, A., BRUCCOLERI, A., MARINOVICH, M., GALLI, C.L. (1997) Induction of tumor necrosis factor-alpha *in vivo* by a skin irritant, tributyltin, through activation of transcription factors: its pharmacological modulation by anti-inflammatory drugs. J. Invest. Dermatol.,108:892-896.

CUMBERBATCH, M., DEARMAN, R.J., GRIFFITHS, C.E., KIMBER, I. (2000). Langerhans cell migration. Clin. Exp. Dermatol., 25: 413–418.

CUMBERBATCH, M., DEARMAN, R.J., ANTONOPOULOS, C., GROVES, R.W., KIMBER, I. (2001). Interleukin (IL)-18 induces Langerhans cell migration by a tumour necrosis factor-alpha and IL-1beta-dependent mechanism. Immunology, 102: 323–330.

de BERNARDIS, E., LEONARDI, G., CARUSO, A., CUTULI, V.M., AMICO-ROXAS, M. (1994). Protective Effects of Papaverine Salicylate in Mouse Ear Dermatitis and PAFInduced Rat Paw Oedema. Agents Actions, 42, 29–33.

de JONGH, C.M., LUTTER, R., VERBERK, M., KEZIC, S. (2007). Differential cytokine expression in skin after single andrepeated irritation by sodium lauryl sulphate. Exp. Dermatol., 16:1032–1040.

DEARMAN, R.J., SCHOLES, E.W., RAMDIN, L.S., BASKETTER, D.A., KIMBER, I. (1994). The local lymph node assay: an interlaboratory evaluation of interleukin 6 (IL-6) production by draining lymph node cells. J. Appl. Toxicol., 14: 287-91.

DEARMAN, R.J., BETTS, C.J., HUMPHREYS, N., FLANAGAN, B.F., GILMOUR, N.J., BASKETTER, D.A., KIMBER, I. (2003). Chemical allergy: considerations for the practical application of cytokine profiling. Toxicol. Sci., 71: 137–145.

EBERHARD, Y., ORTIZ, S., RUIZ LASCANO, A., KUZNITZKY, R., SERRA, H.M. (2004). Up-regulation of the chemokine CCL21 in the skin of subjects exposed to irritans. BMC Immunol., 5:7.

ECVAM (European Centre for the Validation of Alternative Methods) (2000). Statement on the validity of the local lymph node assay for skin sensitization testing. ATLA, 28: 366-367.

EFFENDY, I., LOFFLER, H., MAIBACH, H.I. (2000). Epidermal cytokines in murine cutaneous irritant response., J. Appl. Toxicol., 20: 335–341.

EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP). (2011). Scientific opinion on the safety and efficacy of allylhydroxybenzenes (chemical group 18) when used as flavourings for all animal species. EFSA Journal, 9:2440-2454.

FLUHR, J.W., DARLENSKI, R., ANGELOVA-FISCHER, I., TSANKOV, N., BASKETTER, D. (2008). Skin irritation and sensitization: mechanisms and new approaches for risk assessment. 1. Skin irritation. Skin Pharmacol. Physiol., 21(3):124-135.

GA´BOR, M. (2002). The Mouse Ear as a Model for Cutaneous Irritation. J. Toxicol.—Cut. & Ocular Toxicol., 21: 191–202.

GERBERICK, G.F., RYAN, C.A., DEARMAN, R.J., KIMBER, I. (2007). Local lymph node assay (LLNA) for detection of sensitization capacity of chemicals. Methods, 41: 54-60.

GRANGSJO, A., LEIJON-KULIGOWSKI, A., TORMA, H., ROOMANS, G.M., LINDBERG, M. (1996). Different pathways in irritant contact eczema? Early differences in the epidermal elemental content and expression of cytokines after application of 2 different irritants. Contact Dermatitis, 35: 355–360.

HANEKE, K.E., TICE, R.R., CARSON, B.L., MARGOLIN, B.H., STOKES, W.S. (2001). ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay. Data analyses completed by the National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods. Regul. Toxicol. Pharmacol., 34: 274–286.

HARIYA, T., HATAO, M., ICHIKAWA, H. (1999). Development of a non-radioactive endpoint in a modified local lymph node assay. Food Chem. Toxicol., 37: 87-93.

HATAO, M., HARIYA, T., KATSUMURA, Y., KATO, S. (1995). A modification of the local lymph node assay for contact allergenicity screening: measurement of interleukin-2 as an alternative to radioisotope-dependent proliferation assay. Toxicology, 98: 15-22.

HAYASHI, M., HIGASHI, K., KATO, H., KANEKO, H. (2001). Assessment of preferential Th1 or Th2 induction by low-molecular-weight compounds using a reverse transcription-polymerase chain reaction method: comparison of two mouse strains C57BL/6 and BALB/c. Toxicol. Appl. Pharmacol., 177: 38–45.

HOEFAKKER S., CAUBO M., van't ERVE, E.H., ROGGEVEEN, M.J., BOERSMA, W.J., van JOOST, T., NOTTEN, W.R., CLAASSEN, E. (1995). *In vivo* cytokines profiles in allergic and irritant contact dermatitis. Contact Dermatitis, 33(4), 258-266.

HOFFMAN, D.R., KROLL, L.M., BASEHOAR, A., REECE, B., CUNNINGHAM, C.T., KOENIG, D.W. (2014). Immediate and extended effects of sodium lauryl sulphate exposure on stratum korneum natural moisturizing factor. Int. S. Cosmet. Sci., 36:93-101.

HOMEY, B., von SCHILLING, C., BLUMEL, J., SCHUPPE H.C., RUZICKA, T., AHR, H.J., LEHMANN, P., VOHR, H.W. (1998). An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions. Toxicol. Appl. Pharmacol., 153: 83-94.

ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) (1999). The murine local lymph node assay: a test for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds. The results of an independent peer review evaluation coordinated by the ICCVAM. NIH Publication, 99: 4494.

IDEHARA, K., YAMAGISHI, G., YAMASHITA, K., ITO, M. (2008). Characterization and evaluation of a modified local lymph node assay using ATP content as a non-radio isotopic endpoint. J. Pharmacol. Toxicol. Methods, 58: 1–10.

ITAKURA, A., KIKUCHI, Y., KOURO, T., IKUTANI, M., TAKAKI, S., ASKENASE, P.W., TAKATSU, K. (2006). Interleukin-5 plays an essential role in elicitation of contact sensitivity through dual effects on eosinophils and B-1 cells. Int. Arch. Allergy. Immunol., 140:8-16.

JOHANSEN, J.D. (2003). Fragrance contact allergy: a clinical review. Am. J. Clin. Dermatol., 4: 789-798.

JUNG, K.M., BAE, I.H., KIM, B.H., KIM, W.K., CHUNG, J.H., PARK, Y.H., LIM, K.M. (2010). Comparison of flow cytometry and immunohistochemistry in non-radioisotopic murine lymph node assay using bromodeoxyuridine. Toxicol. Lett., 192: 229–237.

KERN, P.S., GERBERICK, G.F., RYAN, C.A., KIMBER, I., APTULA, A., BASKETTER, D.A. (2010). Local lymph node data for the evaluation of skin sensitization alternatives: a second compilation. Dermatitis, 21: 8-32.

KIMBER, I., BASKETTER, D.A., BUTLER, M., GAMER, A., GARRIGUE, J.L., GERBERICK, G.F., NEWSOME, C., STEILING, W., VOHR, H.W. (2003). Classification of contact allergens according to potency: proposal. Food Chem. Toxicol., 41: 1799-1809.

KIMBER, I., BASKETTER, D.A., GERBERICK, G.F., DEARMAN, R.J. (2002). Allergic contact dermatitis. Int. Immunopharmacol., 2: 201-211.

KIMBER, I., CUMBERBATCH, M., DEARMAN, R.J., BHUSHAN, M., GRIFFITHS, C.E. (2000). Cytokines and chemokines in the initiation and regulation of epidermal Langerhans cell mobilization. Br. J. Dermatol., 142: 401–412.

KIMBER, I., DEARMAN, R.J. (2010). The local lymph node assay and skin sensitization testing. Methods Mol. Biol., 598: 221-231.

KIMBER, I., DEARMAN, R.J. (1991). Investigation of lymph node cell proliferation as a possible immunological correlate of contact sensitizing potential. Food Chem. Toxicol., 29: 125–129.

KIMBER, I., DEARMAN, R.J., SCHOLES, E.W., BASKETTER, D.A. (1994). The local lymph node assay: developments and applications. Toxicology, 93: 13-31.

KOJIMA, H., TAKEYOSHI, M., SOZU, T., AWOGI, T., ARIMA, K., IDEHARA, K., IKARASHI, Y., KANAZAWA, Y., MAKI, E., OMORI, T., YUASA, A., YOSHIMURA, I. (2011). Inter-laboratory validation of the modified

murine local lymph node assay based on 5-bromo-2′-deoxyuridine incorporation. J. Appl. Toxicol., 31: 63–74.

KONDO, S., PASTORE, S., SHIVJI, G.M., McKENZIE, R.C., SAUDER, D.N. (1994). Characterization of epidermal cytokine profiles in sensitization and elicitation phases of allergic contact dermatiti as well as irritant contact dermatitis in mouse skin. Lymphokine Cytokine Res., 13(6), 367-375.

KRASTEVA, M., KEHREN, J., DUCLUZEAU, M.T., SAYAG, M., CACCIAPUOTI, M., AKIBA, H., DESCOTES, J., NICOLAS, J.F. (1999). Contact dermatitis I. Pathophysiology of contact sensitivity. Eur. J. Dermatol., 9: 65-77.

KU, H.O., JEONG, S.H., KANG, H.G., PYO, H.M., CHO, J.H., SON, S.W., KIM, H.R., LEE, K.J., RYU, D.Y. (2008). Intracellular expression of cytokines and granzyme B in auricular lymph nodes draining skin exposed to irritants and sensitizers. Toxicology, 250: 116-123.

KUHN, U., LEMPERTZ, U., KNOP, J., BECKER, D. (1995). A new method for phenotyping proliferating cell nuclear antigen positive cells using flow cytometry: implications for analysis of the immune response *in vivo*. J. Immunol. Methods., 179: 215-222.

LARSEN, W.G. (1977). Perfume dermatitis. A study of 20 patients. Arch. Dermatol., 113: 623–626.

LEE, H.Y., STIEGER, M., YAWALKAR, N., KAKEDA, M. (2013). Cytokines and chemokines in irritant contact dermatitis. Mediators Inflamm., doi: 10.1155/2013/916497.

LEPOITTEVIN, J., LEBLOND, I. (1997). Hapten-peptide T cell receptor interactions: molecular basis for the recognition of haptens by T lymphocytes. Eur. J. Dermatol., 7: 151-154.

LISBY, S., BAADSGAARD, O. (2006). Mechanisms of irritant contact dermatitis in Contact Dermatitis, Frosch, P. J., Menn´e, T., and Lepoittevin, J. P., Eds., Springer Berlin Heidelberg, New York USA. pp. 69–82.

MANETZ, T.S., PETTIT, D.A., MEADE, B.J. (2001). The determination of draining lymph node cell cytokine mRNA levels in BALB/c mice following dermal sodium lauryl sulfate, dinitrofluorobenzene and toluene diisocyanate exposure. Toxicol. Appl. Pharmacol., 171: 174–183.

MARKS, Jr., BELSITO, D.V., DeLEO, V.A., FOWLER, Jr., FRANSWAY, A.F., MAIBACH, H.I., MATHIAS, C.G., PRATT, M.D., RIETSCHEL, R.L., SHERERTZ, E.F., STORRS, F.J., TAYLOR, J.S. (2000). North American Contact Dermatitis Group patch-test results 1996-1998. Arch. Dermatol., 136: 272-273.

McGARRY, H.F. (2007). The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH. Toxicology, 238: 71–89.

McKNIGHT, A.J., BARCLAY, A.N. , MASON, D.W. (1991). Molecular cloning of rat interleukin 4 cDNA and analysis of the cytokine repertoire of subsets of $CD4^+$ T cells. Eur. J. Immunol., 21: 1187–1194.

MELLER, S., LAUERMA, A.I., KOPP, F.M., WINTERBERG, F., ANTHONI, M., MULLER, A., GOMBERT, M., HAAHTELA, A., ALENIUS, H., RIEKER, J., DIEU-NOSJEAN, M.C., KUBITZA, R.C., GLEICHMANN, E., RUZICKA, T., ZLOTNIK, A., HOMEY, B. (2007). Chemokine responses distinguish chemical-induced allergic from irritant skin inflammation: memory T cells make the difference, J. Allergy Clin. Immunol., 119:1470–1480.

MOORE, P.N., SHILOACH, A., PUVVADA, S., BLANKSCHTEIN, D. (2003). Penetration of mixed micelles into the epidermis: effect of mixing sodium dodecyl sulfate with dodecyl hexa (ethylene oxide). J. Cosmet. Sci., 54, 143–159.

MOSMANN, T.R., COFFMAN, R.L. (1989). Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells. Adv. Immunol., 46: 111–147.

NEWBY, C.S., BARR, R.M., GREAVES, M.W., MALLET, A.I. (2000). Cytokine release and cytotoxicity in human keratinocytes and fibroblasts induced by phenols and sodium dodecyl sulfate. J. Invest. Dermatol., 115:292-298.

OUWEHAND, K., SCHEPER, R.J., GRUIJL, T.D., GIBBS, S. (2010). Epidermis-to-dermis migration of immature Langerhans cells upon topical irritant exposure is dependent on CCL2 and CCL5. Eur. J. Immunol., 40:2026-2034.

OECD TG 439. (2013), *In vitro* skin irritation: reconstructed human epidermis test method. OECD Guideline for the Testing of Chemicals, No. 439, OECD, Paris.

OECD TG 442b. (2010). Skin sensitisation: Local lymph node assay: BrdU-ELISA. OECD Guideline For Testing Of Chemicals, No. 442b, OECD, Paris.

OECD TG 429. (2002). Skin sensitization: Local Lymph Node Assay. OECD Guideline For Testing Of Chemicals, No. 429, OECD, Paris.

PICCOTTI, J.R., KNIGHT, S.A., GILLHOUSE, K., LAGATTUTA, M.S., BLEAVINS, M.R. (2006). Evaluation of an ex vivo murine local lymph node assay: multiple endpoint comparison. J. Appl. Toxicol., 26: 333–340.

PICCOTTI, J.R., KAWABATA, T.T. (2008). Use of an Ex Vivo Local Lymph Node Assay to Assess Contact Hypersensitivity Potential. J. Immunotoxicol., 5:271–277.

PLITNICK, L.M., LOVELESS, S.E., LADICS, G.S., HOLSAPPLE, M.P., SELGRADE, M.J., SAILSTAD, D.M.,SMIALOWICZ, R.J. (2002). Cytokine profiling for chemical sensitizers: application of the ribonuclease protection assay and effect of dose. Toxicol. Appl. Pharmacol., 179: 145-154.

PORSTMANN, T., TERNYNCK, T., AVRAMEAS, S. (1985). Quantitation of 5-bromo-2-deoxyuridine incorporation into DNA: an enzyme immunoassay for the assessment of the lymphoid cell proliferative response. J. Immunol. Methods, 82: 169–179.

RASTOGI, S.C., JOHANSEN, J.D. (2008). Significant exposures to isoeugenol derivatives in perfumes. Contact Dermatitis, 58: 278–281.

ROMAGNANI, S. (1991). Human TH1 and TH2 subsets: doubt no more. Immunol. Today, 12: 256–257.

SAÇAR, H., SAÇAR, T. (2013). Topikal Kantaridin Kullanımı Sonrası Gelişen Satellit Verruka Lezyonları. Tıp Araştırmaları Dergisi, 11:132-134.

SAILSTAD, D.M., HATTAN, D., HILL, R.N., STOKES, W.S. (2001). ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay. The ICCVAM review process. Regul. Toxicol. Pharmacol., 34: 249–257.

SAINT-MEZARD, P., ROSIERES, A., KRASTEVA, M., BERARD, F., DUBOIS, B., KAISERLIAN, D., NICOLAS, J.F. (2004). Allergic contact dermatitis. Eur. J. Dermatol., 14: 284-295.

SCHNUCH, A., LESSMANN, H., GEIER, J., FROSCH, P.J., UTER, W. (2004). Contact allergy to fragrances: frequencies of sensitization from 1996 to 2002. Results of the IVDK. Contact Dermatitis, 50: 65–76.

SIKORSKI, E.E., GERBERICK, G.F., RYAN, C.A., MILLER, C.M., RIDDER, G.M. (1996). Phenotypic analysis of lymphocyte subpopulations in lymph nodes draining the ear following exposure to contact allergens and irritants. Fundam. Appl. Toxicol., 34: 25-35.

SMITH PEASE, C.K., BASKETTER, D.A., PATLEWICZ, G.Y. (2003). Contact allergy: the role of skin chemistry and metabolism, Clin. Exp. Dermatol., 28: 177-183.

SUDA, A., YAMASHITA, M., TABEI, M., TAGUCHI, K., VOHR, H.W., TSUTSUI, N., SUZUKI, R., KIKUCHI, K., SAKAGUCHI, K., MOCHIZUKI, K., NAKAMURA, K. (2002). Local lymph node assay with non-radioisotope alternative endpoints. J. Toxicol. Sci., 27: 205–218.

TAKEYOSHI, M., YAMASAKI, K., YAKABE, Y., TAKATSUKI, M., KIMBER, I. (2001). Development of non-radio isotopic endpoint of murine local lymph node assay based on 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) incorporation. Toxicol. Lett., 119: 203-208.

TAKEYOSHI, M., SAWAKI, M., YAMASAKI, K., KIMBER, I. (2003). Assessment of statistic analysis in non-radioisotopic local lymph node assay (non-RI-LLNA) with alpha-hexylcinnamic aldehyde as an example. Toxicology, 191: 259–263.

TAKEYOSHI, M., IIDA, K., SHIRAISHI, K., HOSHUYAMA, S. (2005). Novel approach for classifying chemicals according to skin sensitizing potency by nonradioisotopic modification of the local lymph node assay. J. Appl. Toxicol, 25: 129-134.

TAKEYOSHI, M., NODA, S., YAMASAKI, K., KIMBER, I. (2006). Advantage of using CBA/N strain mice in a non-radioisotopic modification of the local lymph node assay. J. Appl. Toxicol, 26: 5-9.

TANAKA, S., ROYDS, C., BUCKLEY, D., BASKETTER, D.A., GOOSSENS, A., BRUZE, M., SVEDMAN, C., MENNE, T., JOHANSEN, J.D., WHITE, I.R., McFADDEN, J.P. (2004). Contact allergy to isoeugenol and its derivatives: problems with allergen substitution. Contact Dermatitis, 51: 288–291.

TONELLI, G., THIBAULT, L., RINGLER, I. (1965). A bio-assay for the Concomitant Assessment of the Antiphlogistic and Thymolytic Activities of Topically Applied Corticoids. Endocrinology, 77: 625–634.

TOWBIN, H., PIGNAT, W., WIESENBERG, I. (1995). Time-Dependent Cytokine Production in the Croton Oil-Induced Mouse Ear Oedema and Inhibition by Prednisolone. Inflamm. Res. 44 (Suppl. 2), S160–S161.

ULKER, O.C. (2010). Kimyasalların radyoaktif olmayan lokal lenf düğümü yöntemi ile rölatif temas alerjisi potansiyellerinin araştırılması ve yama testi sonuçları ile karşılaştırılması. Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı Doktora Tezi., 24-30,102-105.

ULKER, O.C., ATAK, A., ATES, I., KARAKAYA, A. (2011). Evaluation of auricular lymph node cell lymphocyte proliferation and cytokine production as non-radioactive endpoints during murine contact allergy. J. Immunotoxicol., 8: 131–139.

ULKER, O.C., ATES, I., ATAK, A., KARAKAYA, A. (2013). Evaluation of non-radioactive endpoints of ex vivo local lymph node assay-BrdU to investigate select contact sensitizers. J. Immunotoxicol., 10: 1-8.

ULKER, O.C., KAYMAK, Y., KARAKAYA, A. (2014). Allergenicity evaluation of fragrance mix and its ingredients by using ex vivo local lymph node assay–BrdU endpoints. Food. Chem. Toxicol., 65:162-167.

VAN OCH, F.M., VAN LOVEREN, H., de JONG, W.H., VANDEBRIEL, R.J. (2002). Cytokine production induced by low-molecular-weight chemicals as a function of the stimulation index in a modified local lymph node assay: an approach to discriminate contact sensitizers from respiratory sensitizers. Toxicol. Appl. Pharmacol., 184: 46–56.

VANDEBRIEL, R.J., DE JONG, W.H., HENDRIKS, J.J., VAN LOVEREN, H. (2003). Impact of exposure duration by low molecular weight compounds on interferon-gamma and interleukin-4 mRNA expression and production in the draining lymph nodes of mice. Toxicology, 188: 1–13.

VOHR, H.W., AHR, H.J. (2005). The local lymph node assay being too sensitive? Arch. Toxicol., 79: 721-728.

WANG, B., ZHUANG, L., FUJISAWA, H., SHINDER, G.A., FELICIANI, C., SHIVJI, G.M., SUZUKI, H., AMERIO, P., TOTO, P., SAUDER, D.N. (1999). Enhanced epidermal Langerhans cell migration in IL-10 knockout mice. J. Immunol., 162: 277–283.

WHITE, J.M., WHITE, I.R., GLENDINNING, A., FLEMING, J., JEFFERIES, D., BASKETTER, D.A., McFADDEN, J.P., BUCKLEY, D.A. (2007). Frequency of allergic contact dermatitis to isoeugenol is increasing: a review of 3636 patients tested from 2001 to 2005. Br. J. Dermatol., 157: 580–582.

WOOLHISER, M.R., HAYES, B.B., MEADE, B.J. (1998). A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitization and irritancy potential of chemicals. Toxicol. Mech. Methods., 8: 245-256.

WRIGHT, Z.M., BASKETTER, P.A., BLAIKIE, L., COOPER, K.J., WARBRICK, E.V., DEARMAN, R.J., KIMBER, I. (2001). Vehicle effects on skin sensitizing potency of four chemicals: assessment using the local lymph node assay. Int. J. Cosmet. Sci., 23:75-83.

http://greencleaning.about.com/od/GreenCleaningResources/g/Sodium-Laureth-Sulfate-What-It-Is-How-It-S-Used-And-More.htm
Erişim Tarihi: 03.05.2014.

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı- Soyadı:	Seren Arancıoğlu
Doğum yeri ve tarihi:	Kars/Merkez – 01.12.1988
Uyruğu:	T.C.
Medeni Durumu:	Bekar
İletişim adresi:	Konya Kulu Devlet Hastanesi Eczane Birimi, Kulu, Konya
Telefon:	0332 6416100

II- Eğitimi

Kars Anadolu Lisesi, 2006
Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, 2011

III- Mesleki Deneyimleri

2011- 2013	Ankara Mayıs Eczanesi – Eczacı ve Mesul Müdür
2013- Halen	Konya Kulu Devlet Hastanesi – Eczacı